



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**CULTIVO Y ENSAYOS *IN VITRO* DE LAS FORMAS ERITROCÍTICAS DEL
PARÁSITO PRODUCTOR DE LA MALARIA (*Plasmodium falciparum*).
CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS QUÍMICOS CON ACTIVIDAD
ANTIMALÁRICA: 4(1H)-PIRIDONAS**

MARÍA RONCALÉS POZA

MADRID, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**CULTIVO Y ENSAYOS *IN VITRO* DE LAS FORMAS ERITROCÍTICAS DEL
PARÁSITO PRODUCTOR DE LA MALARIA (*Plasmodium falciparum*).
CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS QUÍMICOS CON ACTIVIDAD
ANTIMALÁRICA: 4(1H)-PIRIDONAS**

**Memoria para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por la Universidad
Autónoma de Madrid**

Presentada por María Roncalés Poza

Directores

Dra. Esperanza Herreros

Dr. Pedro Bonay

Madrid, 2015

En memoria de mamá

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que ya haya llegado este momento, el camino ha sido largo y duro y ahora mismo los sentimientos están entremezclados. Por un lado la alegría de terminar (para que nos vamos a engañar!!), por otro lado el orgullo de todo lo que he aprendido por el camino y finalmente la inmensa serenidad que se siente cuando uno sabe que ha hecho lo correcto. Nada de esto habría sucedido sin el esfuerzo y un poquito de suerte que me ha acompañado desde que empecé como becaria hace ya 13 años. Así que tengo que dar las gracias por todo esto a mucha gente.

En primer lugar gracias a la Fundación Universidad Empresa y a la Universidad Autónoma por las becas Citius, que permiten que muchos recién licenciados comiencen su andadura en el mundo empresarial. Gracias a GlaxoSmithKline y la *MMV* por confiar en mí tras la beca y por ayudarme a formarme como mejor científica y persona.

Gracias a Esperanza Herreros por contar conmigo desde el principio, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo, de ir creciendo como persona y sobre todo por aceptar el dirigirme la tesis y por su apoyo incondicional durante todo el proceso, por sus ánimos en los momentos de flaqueza, por sus consejos y porque siempre has estado ahí cuando te he necesitado.

Gracias a Pedro Bonay, por aceptar ser mi co-director, por transmitir esa serenidad siempre, que hace que todo sea mucho más sencillo de lo que parece. Gracias por tu disponibilidad y por tu tiempo, por estar pendiente y por los ánimos en todo momento.

Gracias a Mada por su paciencia y ayuda con todo el papeleo.

Gracias a todos los compis de GSK, desde que empecé en el grupo de Microbiología Experimental hasta ahora en el grupo de Parasitología y Bioquímica. Especialmente a Sonia y M^a Jesús por enseñarme a trabajar, “en condiciones de esterilidad”, desde el primer día!! Por los buenos momentos pasados y también por algunos de los malos, que nos han hecho crecer juntas (que no envejecer!!!), por vuestros ánimos y por las correcciones de última hora.

Gracias muy especialmente a Jaume, porque juntos hemos hecho grandes cosas!! Gracias por ser un jefe cercano, por cuestionar las cosas para que aprendiera más, por alentarme siempre a seguir formándome a pesar de las dificultades y de los cambios, por tus sabios consejos, por tu paciencia y tu tiempo, por saber que siempre puedo contar contigo y por la amistad que tenemos, se te echa de menos por el P3!!!

Gracias también a Mjo, por estar siempre pendiente, por ayudarme con los ensayos enzimáticos y bioquímicos. Por la confianza depositada en mí, por tus ánimos siempre, por facilitar las cosas y por cuidar mucho de tu gente!!!!

Gracias a mis compis del labo2, a Irene, Carol y Nando por sus consejos “tesineros” y alentarme en los momentos de agobio. A Marga por su ayuda con la química y las estructuras...

Muchas gracias a las niñas, especialmente a Sara, Olalla y Gracia, porque trabajar con vosotras es un placer, por los buenos ratos que pasamos y las risas (“orrili”!!!), por hacer que el trabajo sea agradable y por haberme aguantado en los momentos de bajón o de nervios, que alguno que otro ha habido...

A Ane, Sarita, Lourdes, Bea e Ilaria, porque además de compañeras sois muy buenas amigas, que siempre estáis cuando se necesita y que me habéis robado un trocito de corazón!!

A mis amigas, las “galeguiñas” y “pichonas”, también “a los más feos”, ya sabéis quienes sois... por estar pendiente de mí, por animarme en todo momento y por hacerme sentir siempre muy especial. Gracias especialmente a Javiera, Tami, Raquel y Reyes porque no se puede tener unas mejores amigas, por vuestra disponibilidad siempre a pesar de los trabajos, niños, etc. Porque siempre he podido contar con vosotras y porque habéis contribuido enormemente a que sea una mejor persona.

Gracias a mi familia, a Tiana y Blanca, a las primísimas, especialmente TataElena, Isa y Pilar, porque me hacéis sentir genial, por las risas y los consejos, por los ánimos y porque siempre nos quedará Burdeos!!!

Gracias a mis padres, por darme la vida, un hogar feliz y unos valores que me han acompañado siempre. Gracias papá por tu ayuda con los peques y por escucharme cuando lo he necesitado, mamá estaría muy orgullosa de ti!! Mamá, se te sigue echando de menos como el primer día.

Gracias a Laila y Miguel, por echarnos una mano cuidando a los sobrinos para tener más tiempo para escribir. Miguel gracias en especial, por seguir siempre adelante!!

Gracias a Diego y Carola y Rafa y Ale porque siempre estabais dispuestos a hacer de canguros, por los ánimos y por cuidar de todos nosotros!!

Gracias muy especialmente a mis niños, Elena y Roque, porque sois el mejor proyecto de mi vida, por vuestras risas y sonrisas, por vuestras caras de asombro cuando os hablamos de ciencia, por el “malásito”, palabra inventada por Elena que hace alusión a malaria y el parásito!!! Perdonar si en los últimos meses hemos estado más irritables o

agobiados, pero escribir papá y mamá las tesis a la vez sólo se nos podía ocurrir a nosotros!!

Gracias a David, por el gran equipo que formamos, por ayudarme siempre, por crecer juntos, por respetarme y animarme siempre a seguir, por ser capaces de organizarnos tan bien para haber llegado los dos hasta aquí y por todo lo que nos queda por vivir...

ABREVIATURAS

%p.:	Porcentaje de parasitemia
[³ H]:	Hipoxantina tritiada
A:	Adenosina
a.C:	Antes de Cristo
ACTs:	<i>Artemisinin combination therapies</i> , tratamiento en combinación con artemisinina del inglés
Ad35:	Adenovirus recombinantes
Ad5:	Adenovirus recombinantes
ADN:	Ácido dextrirribonucleico (<i>DNA</i> en inglés)
AJ:	Anillo joven
AMA-1:	<i>Apical Membrane Antigen</i> , antígeno de la parte apical de la membrana del inglés
AMPC:	Monofosfato de adenosina cíclico
ap:	Prominencia apical o complejo apical
AP2-G:	<i>DNA-binding protein PfAP2-G</i> , Proteína 2 de unión al ADN del inglés
A-PG:	<i>Malarone</i>
AS01:	Adyuvante vacuna RTS,S
ATOV:	Atovaquona (A en Tabla 3)
ATP:	Adenosin trifosfato
AV:	Anillo viejo
bc1:	Citocromo <i>bc1</i> : complejo ubiquinol citocromo c oxidoreductasa (Complejo III)
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina de suero bovino del inglés
C:	Citosinas o candidato en Figura 34
C5:	Carbono 5
CD36:	<i>Cluster of differentiation 36</i>
CeLTOS:	Proteínas transversales de células de ooquinetos y esporozoítos
CF:	Citometría de flujo

Cit.:	Citocromo
cm ² :	Centímetros cuadrados
COX:	Citocromo Oxidasa (Complejo IV)
cpm:	Cuentas por minuto
CQ:	Cloroquina
CSA:	<i>Chondroitin sulphate A</i>
CSP:	<i>Circumsporozoite protein</i>
CytC:	Citocromo C
D:	Dapsona (Sulfona)
d:	Gránulos densos
DBP:	<i>Duffy binding proteins</i> , proteínas de unión tipo Duffy del inglés
DDT:	1,1,1-tricloro-2,2-bis-(4-clorofenil)- etano
DDW:	<i>Diseases of Developing World</i>
DHA:	Dihidroartemisinina
DHO-DH:	Dihidro-orotato deshidrogenasa
DMSO:	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DPBS:	<i>Dulbecco's-PBS</i>
e-:	Electrónico
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EGTA:	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EJ:	Esquizonte joven
EMEM:	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
EV:	Esquizonte viejo
FIC:	Concentración inhibitoria fraccional
FL-2:	Fluorescencia bidimensional
G:	Guaninas
G3P-DH :	Glicerol -3-fostato-deshidrogenasa o G3PD en figura 35

G6PD:	Glucosa 6-P deshidrogenasa
GMAP:	<i>The Global Malaria Action Plan</i> , Plan de Acción Global contra la Malaria del inglés
GMAP2:	Segunda parte del Plan de Acción Global contra la Malaria
GSK:	<i>GlaxoSmithKline</i>
HEPES:	<i>(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)</i>
HT:	Hipoxantina
HTS:	High throughput Screening, cribado de alto rendimiento del inglés
IC ₅₀	Concentración que inhibe al 50% de los parásitos
IC ₉₀	Concentración que inhibe al 90% de los parásitos
ICAM-1:	Molécula de adhesión intercelular tipo 1
ITN:	<i>Insecticide treated nets</i> , mosquiteras tratadas con insecticidas del inglés
k:	<i>Knobs</i>
Kb:	Kilobases
l:	Vacuola lipídica
LUE:	<i>Lysed uninfected erythrocytes</i>
m:	Merozoítos
MalariaGEN:	<i>The Malaria Genomic Epidemiology Network</i>
Mb:	Millones de bases
MDGs:	<i>Millennium Development Goals</i>
Me-TRAP:	Proteínas de adhesión relacionadas con epítomos múltiples de tromboespondina
MIM:	<i>Multilateral Initiative on Malaria</i> , Iniciativa Multilateral en Malaria del inglés
mL:	Mililitros
mM:	Milimolar
MMV:	<i>Malaria for Medicines Venture</i>
MO:	Microscopía óptica

MQ:	Mefloquina
MR4:	<i>Malaria Research and Reference Reagent Reasource Center</i>
MSP-1:	Proteínas de superficie de merozoítos tipo 1
MSP3:	Proteínas de superficie de merozoítos tipo 3
MVA:	Ankara virus
n:	Núcleo
°C:	Grados centígrados
OMICS:	Genómica, proteómica, metabolómica
OMS:	Organización Mundial de la Salud
ONU:	Organización de las Naciones Unidas
OZ277:	<i>Arterolane</i>
OZ439:	<i>Artefenomel</i>
<i>P.</i> :	<i>Plasmodium</i>
p:	Vacuola pigmentaria
P:	Plasmion
PBS:	<i>Phosphate-buffered saline</i>
P-D:	<i>Maloprim</i>
<i>P. f.</i> :	<i>P. falciparum</i>
PfATP4:	<i>Na⁺-ATPase 4</i>
PfCARL:	<i>Cyclic amine resistance locus</i>
PfCHT1,2,4:	<i>Aspartic protease plasmepsins I, II, IV</i>
PfCRT:	<i>Cloroquine resistant transporter</i>
PfCYTbc1:	<i>Cytochrome bc1</i>
PfDHFR:	<i>Dihydrofolate reductase</i>
PfDHODH:	<i>Dihydroorotate dehydrogenase</i>
PfDXR:	<i>1 -deoxy-D-xylulose 5 -phosphate reductoisomerase</i>
PfEMP1:	<i>P. falciparum erythrocyte membrane protein 1</i>

PfFP2-3:	<i>Falcipain cysteine proteases 2-3</i>
PfGLURP:	<i>Glutamate-rich protein of P. falciparum</i>
PfHDAC1:	<i>Histone deacetylase</i>
PfPI4K:	<i>Phosphatidylinositol -4 kinase</i>
Pfs230:	Antígenos de superficie de gametocitos de <i>P. falciparum</i>
Pfs25:	Antígenos de superficie de cigotos/ooquinetos de <i>P. falciparum</i>
PfSPZ:	<i>P. falciparum</i> sporozoites, esporozoítos de <i>P. falciparum</i> del inglés
PG:	Proguanil
PIR:	Pirimetamina o P (tabla 3)
PMSF:	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
pRBCs:	Eritrocitos parasitados, <i>parasitized red blood cells</i> del inglés
P-S:	<i>Fansidar</i>
psi:	Unidad de presión, del inglés <i>Pounds per Square Inch</i>
<i>P. v</i> :	<i>P. vivax</i>
QS-21:	Saponina
r:	Roptria
RBCs:	<i>Red Blood Cells</i> , eritrocitos del inglés
RBM:	<i>Roll Back Malaria</i>
RP:	Ratio de parásitos
rpm:	Revoluciones por minuto
RPMI:	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTS,S:	Región repetida R, Células T, hepatitis B (S)
S:	Sorbitol principalmente, Sulfadoxina en tabla 3
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDH:	Succinato deshidrogenasa
SERCaP:	<i>Single exposure, radical cure and profilaxis</i>
Sinc.:	Sincrónico

SumFIC:	Suma de FICs
T:	Timina
TJ:	Trofozoíto joven
Tox ₅₀ :	Concentración que disminuye la reducción de resazurina un 50%
TV:	Trofozoíto viejo
UNICEF:	<i>United Nations International Children's Emergency Fund</i>
UQ:	Ubiquinona o Q
UQH ₂ :	Ubihidroquinona o QH ₂
v:	Citostoma
WHO:	<i>World Health Organization</i>

ÍNDICE

SUMMARY	1
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Malaria: Descripción y características de la enfermedad.....	11
1.1.1. Historia y descubrimiento de la malaria.	11
1.1.2. Epidemiología	13
1.1.3. Sintomatología y complicaciones de la malaria.	16
1.1.3.1. Malaria no complicada.	16
1.1.3.2. Malaria complicada o severa.	17
1.2. Descripción del parásito como agente infeccioso causante de la malaria. .	19
1.2.1. Taxonomía.....	19
1.2.2. Morfología del parásito.	19
1.2.3. Ciclo biológico.	21
1.2.3.1. Fase Asexual	22
1.2.3.2. Fase Sexual.	24
1.2.4. Genómica.	25
1.3. Estrategias para erradicar la malaria.	26
1.3.1. Vacunas.	27
1.3.2. Antimaláricos-Resistencias.	29
1.3.3. Desarrollo de nuevos antimaláricos.....	31
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Condiciones generales de cultivo.....	39
3.1.1. Medio completo de cultivo.....	39
3.1.2. Glóbulos rojos o eritrocitos (<i>Red Blood Cells, RBCs</i>).	39
3.1.3. Parásitos.	39
3.1.4. Protocolo de descongelación de los parásitos... ..	40

3.1.5. Protocolo de sincronización de los parásitos.	41
3.1.5.1. Tratamiento con Sorbitol.	41
3.1.5.2. Tratamiento con Plasmion.	41
3.2. Tratamientos de sincronización específicos	42
3.2.1. Sincronización de formas asexuales	42
3.2.1.1. Sorbitol 34 horas	42
3.2.1.2. Sorbitol 6 horas.....	43
3.2.2. Sincronización de formas sexuales o gametocitos.	43
3.3. Tratamientos específicos para inducir la gametocitogénesis.....	43
3.3.1. Método de <i>Akompong</i>	44
3.3.2. Método de <i>Bennett</i>	44
3.3.3. Método de <i>Chavalitshewinkoon-Petmitr</i>	44
3.3.4. Método de <i>Chavalitshewinkoon-Petmitr+Bennett</i>	44
3.3.5. Método de <i>Schneweis</i>	45
3.3.6. Método de <i>Chutmongkonkul</i>	45
3.3.7. Método combinado de <i>Chutmongkonkul+Schneweis</i>	45
3.3.8. Método combinado de <i>Chavalitshewinkoon-Petmitr+Schneweis</i>	46
3.4. Protocolos de los distintos ensayos realizados para definir el perfil antimalárico de las 4(1H)-piridonas.	46
3.4.1. Inhibición de la actividad de la ubiquinol-citocromo c reductasa (complejo <i>bcl</i> ó III).	46
3.4.2. Ensayo en célula entera. Determinación de la IC ₅₀ e IC ₉₀	47
3.4.3. Ensayo de citotoxicidad.....	48
3.4.4. Ensayo de actividad sobre formas asexuales eritrocíticas.....	49
3.4.4.1. Método de incorporación de [³ H]-hipoxantina.	50
3.4.4.2. Análisis por microscopía óptica (MO).	50
3.4.4.3. Análisis por citometría de flujo (CF).	50
3.4.5. Ensayo de velocidad de acción.....	51

3.4.6. Actividad sobre formas sexuales o gametocitos.....	51
3.4.7. Combinaciones de las 4(1H)-piridonas con otros antimaláricos.	52
3.4.8. Recrudescencia <i>in vitro</i>	53
4. RESULTADOS.	57
4.1. Obtención <i>in vitro</i> de formas eritrocíticas de <i>P. falciparum</i>.	59
4.1.1. Método optimizado de obtención <i>in vitro</i> de formas eritrocíticas asexuales altamente sincrónicas de <i>P. falciparum</i>	59
4.1.1.1. Sorbitol 34 horas.	59
4.1.1.2. Sorbitol 6 horas.	60
4.1.1.3. Método optimizado de sincronización.	65
4.1.2. Método optimizado de obtención <i>in vitro</i> de formas sexuales (gametocitos) de <i>P.</i> <i>falciparum</i>	68
4.2. Estudio de la actividad antimalárica de las 4(1H)-piridonas.	73
4.2.1. Actividad sobre el complejo <i>bc1</i> (complejo III).	74
4.2.2. Actividad antimalárica en célula entera.	75
4.2.3. Citotoxicidad.	76
4.2.4. Actividad sobre formas asexuales eritrocíticas.	78
4.2.4.1. Método de incorporación de [³ H]-hipoxantina.	78
4.2.4.2. Método de microscopía óptica.	81
4.2.4.3. Método de citometría de flujo.	82
4.2.5. Velocidad de acción.	84
4.2.6. Actividad sobre formas sexuales eritrocíticas (gametocitos).	85
4.2.7. Ensayo de combinaciones de las 4(1H)-piridonas con otros antimaláricos.	87
4.2.8. Recrudescencia <i>in vitro</i>	88
5. DISCUSIÓN.	93
5.1. Obtención <i>in vitro</i> de formas eritrocíticas de <i>P. falciparum</i>	95
5.2. Estudio de la actividad antimalárica de la serie química 4(1H)-piridonas.	102
6. CONCLUSIONES	111
7. BIBLIOGRAFÍA	115

ANEXO (PUBLICACIONES).	127
I. <i>In Vitro</i> Culture of <i>Plasmodium falciparum</i>: Obtention of Synchronous Asexual Erythrocytic Stages.	129
II. Comparison and Optimization of Different Methods for the <i>In Vitro</i> Production of <i>Plasmodium falciparum</i> Gametocytes	139
III. Stage-specific activity and time-inhibition curves of 4(1H)-pyridones as potent antimalarial compounds against <i>P. falciparum</i> parasites.	147

SUMMARY

Malaria is the most important parasitic infection with a significant global impact on the health of hundreds of millions of people annually. The worldwide prevalence of malaria and the development of parasite-resistance to antimalarial drugs, such as artemisinin, have given added impetus to the development of new antimalarial agents.

The *in vitro* culture of the erythrocytic asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum* parasites, required a lot of effort and time in order to develop a continuous *in vitro* culture. The development of new methods to synchronize the asexual erythrocytic stages and to obtain the sexual stages or gametocytes of *P. falciparum* parasites could improve the development of new drugs against malaria.

An optimized method of synchronization has been established which enables the maintenance of a healthy highly synchronic culture for longer periods of time. The specific asexual erythrocytic stages of a complete life cycle of *P. falciparum* parasites, with the estimated time of appearance of each stage well defined, has been obtained, being the starting point of assays for specific stage activity.

The generation of sexually committed parasites (gametocytogenesis) is poorly understood in malaria. If the mechanisms regulating this process were elucidated, new opportunities for blocking malaria transmission could be revealed. An improved method that combines several factors critical for gametocytogenesis, has been developed for the *in vitro* production of *P. falciparum* gametocytes in order to obtain large numbers of biological studies, such as the identification of new medicines with transmission-blocking potential.

4(1H)-pyridones represent a novel class of antimalarial agents which act as potent selective inhibitors of *Plasmodium* mitochondrial function by blocking the electron transport chain. Their antimalarial profile has been evaluated being potent against *P. falciparum* isolates and showing no cross-resistance with agents currently used, including atovaquone. 4(1H)-pyridones are slow-acting antimalarials effective fundamentally against late trophozoites and early schizonts but without activity against young gametocytes. No antagonist effects have been observed in combinations assays with other antimalarials tested; being remarkable that unlike atovaquone, another mitochondrial inhibitor, they do not show any synergistic effect when are combined with proguanil. This suggests a different mechanism of action of atovaquone, making 4(1H)-pyridones more attractive as novel potential antimalarials drugs.

RESUMEN

La malaria es la infección parasitaria más importante con un gran impacto global sobre la salud de centenares de millones de personas anualmente. La prevalencia mundial de la malaria y el desarrollo de resistencias de los parásitos a los antimaláricos habitualmente empleados, como la artemisinina, han favorecido el desarrollo de nuevos agentes antimaláricos.

El cultivo *in vitro* de las fases eritrocíticas asexuales y sexuales del parásito *Plasmodium falciparum* requiere una gran cantidad de tiempo y esfuerzo para desarrollar un cultivo continuo *in vitro*. El desarrollo de nuevos métodos para sincronizar las fases eritrocíticas asexuales y para obtener las fases sexuales o gametocitos de *P. falciparum*, contribuiría favorablemente en el desarrollo de nuevas drogas contra la malaria.

Un método optimizado de sincronización ha sido establecido, permitiendo además el mantenimiento de un cultivo sano, altamente sincrónico, durante largos periodos de tiempo. De este modo, se han obtenido las distintas formas eritrocíticas asexuales específicas del ciclo de vida completo del parásito *P. falciparum*, constituyendo a su vez el punto de partida de los ensayos que valorarán la actividad específica de cada estadio eritrocítico.

La gametocitogénesis o generación de parásitos sexualmente comprometidos (gametocitos), es un proceso no del todo aún conocido en malaria. Si los mecanismos reguladores de este proceso fueran establecidos, se presentarían nuevas oportunidades para interrumpir la transmisión de la malaria. Se han considerado varios factores críticos para la gametocitogénesis, cuyo estudio y combinación, han permitido establecer un método optimizado de producción *in vitro* de gametocitos de *P. falciparum*. Este método de obtención de gametocitos permitirá a su vez, realizar los estudios biológicos con los que se identifiquen nuevos antimaláricos con potencial efecto en el bloqueo de la transmisión de la malaria.

Las 4(1H)-piridonas son una clase de antimaláricos que actúan como potentes inhibidores selectivos de la función mitocondrial de *Plasmodium*, al bloquear la cadena de transporte electrónico del parásito. Su perfil antimalárico se ha evaluado resultando muy potentes *in vitro* frente a *P. falciparum*, sin mostrar además resistencia cruzada con otros antimaláricos comerciales utilizados, como la atovaquona, aunque con una velocidad de acción más lenta que la cloroquina o la artemisinina. Las 4(1H)-piridonas

son específicamente efectivas sobre las formas maduras asexuales, trofozoítos viejos y esquizontes jóvenes, pero no así frente a los gametocitos. En los ensayos de combinaciones con otros antimaláricos comerciales testados, no se han observado efectos antagonistas, siendo destacable que las 4(1H)-piridonas, a diferencia de lo que ocurre con otro inhibidor mitocondrial como es la atovaquona, no muestran ningún efecto sinérgico si se combinan con proguanil. Este hecho sugiere un diferente mecanismo de acción que la atovaquona, haciendo que las 4(1H)-piridonas resulten más atractivas como potenciales drogas antimaláricas.

INTRODUCCIÓN

1.1. Malaria: Descripción y características de la enfermedad

1.1.1. Historia y descubrimiento de la malaria

La malaria es una de las enfermedades parasitarias más graves y de mayor incidencia a nivel mundial, siendo la causa de más de 500.000 muertes anuales, 90% de las cuales son producidas en África Sub-Sahariana, afectando sobre todo a niños menores de cinco años (WHO, 2014). Si bien la enfermedad se conocía desde la más remota antigüedad. En el antiguo Egipto (1500 años a.C.) fueron encontrados papiros con descripciones de procesos febriles y hepatomegalia que además relacionaban el carácter intermitente de estas fiebres con las inundaciones del Nilo (Sherman, 1998). Posteriormente estos hechos fueron demostrados con el aislamiento de antígenos maláricos en muestras de piel y mucosas de momias egipcias (3200-1304 años a.C.) (Miller et al., 1994). Uno de los primeros registros sobre la malaria data del año 2700 a.C. Se trata de un documento médico chino “*Nei Ching*” preparado para el emperador Huang Ti que describe fiebres tercianas (producidas cada tres días), cuartanas (cada cuatro días) y otros síntomas tales como esplenomegalia, sudores, escalofríos, etc. (Bruce-Chwatt, 1988). Hipócrates (460-370 a.C.) clasificaba las fiebres como cotidianas, semi-tercianas, tercianas y cuartanas en su libro “*Epidemias*”, relacionándolas además con síntomas de esplenomegalia y con el agua de zonas pantanosas. Pero no fue hasta años más tarde (116-27 a. C.) cuando Marcus Terentius Varro llegó a postular la existencia de algún animal que vía aérea contagiaba las “*fiebres pantanosas*” al ser humano (Boyd, 1949). La constante relación histórica de las fiebres con las zonas pantanosas dio origen a los dos nombres con los que se conoce la enfermedad: Paludismo (Del latín *palus*, pantano) o Malaria (del italiano *mal'aria*, mal aire). Así, durante la época de la República Romana, la enfermedad se definía como “*fiebre romana*” por su gran incidencia especialmente en las zonas pantanosas próximas a Ostia (*Roman Campagna*) (Sherman, 1998) existiendo múltiples descripciones de los síntomas de la enfermedad e incluso de las posibles causas de la misma (Bruce-Chwatt, 1988). Durante el declive del Imperio Romano y posteriormente en la Edad Media no existe gran constancia de escritos que hagan referencia a la enfermedad, aunque es de suponer que las epidemias seguirían ocurriendo e incluso que debido al aumento de población a lo largo de los siglos como a su constante redistribución geográfica, la enfermedad se diese por todo el continente europeo. En el siglo XII se sabe que la

malaria llegó al Oeste de España, Polonia e incluso Rusia y durante el siglo XV las fiebres intermitentes eran comunes por todo el Este de Europa (Bruce-Chwatt, 1988; Sherman, 1998). Durante los siglos XVII-XVIII la malaria fue prevalente en Inglaterra, donde muchos de los casos eran importados por soldados y esclavos procedentes de las expediciones de India y África (Bruce-Chwatt, 1988; Sherman, 1998). Así, en torno al 1800 la malaria tenía ya una distribución geográfica mundial (Sherman, 1998) pero no fue hasta después de la Segunda Guerra Mundial (1945), cuando se empezó a luchar con gran esfuerzo con el fin de erradicar la enfermedad, consiguiéndose eliminar en muchas zonas geográficas, salvo en África Tropical y en ciertas áreas de Asia donde la enfermedad persiste aún en nuestros días (Greenwood et al., 2005).

Durante el siglo XIX fueron muchas las investigaciones llevadas a cabo para descubrir al agente causal de la malaria. Inicialmente fue descrito por Edwin Klebs y Corrado Tomassi-Crudeli como *Bacillus malariae* (consideraban haber aislado del barro de zonas pantanosas así como de la orina de pacientes infectados a la bacteria causante de la enfermedad) si bien, todos los esfuerzos por cultivar esta bacteria (que describían con forma de vara) procedente de la sangre de pacientes con fiebres tercianas fueron inútiles (Sherman, 1998). En Noviembre de 1880, Charles Laveran, cirujano de la armada francesa, observando en su microscopio una muestra de sangre de un soldado aquejado con fiebres, identificó una forma redondeada con una serie de flagelos transparentes y móviles, que clasificó como parásito y denominó *Oscillaria malariae*. Laveran llegó a identificar cuatro formas diferentes de parásitos: formas de media luna, formas esféricas con flagelos móviles (descritas posteriormente como gametocitos femeninos y masculinos), formas esféricas inmóviles y con pigmento en su interior, y formas pigmentadas mucho más pequeñas (trofozoítos) (Laveran, 1880). Estos descubrimientos fueron aceptados con escepticismo por parte de la comunidad científica. En 1884 investigadores italianos, entre ellos Tomassi-Crudeli denominaron *Plasmodium malariae* a las formas ameboides no pigmentadas y móviles que observaban en el interior de los eritrocitos de muestras de sangre fresca. En 1885, los descubrimientos de Laveran fueron confirmados, describiéndose el acúmulo del pigmento (hemozoína) así como el desarrollo del parásito en el interior de los eritrocitos (Boyd, 1949). Posteriormente, Camillo Golgi identificó como *Plasmodium vivax* y *Plasmodium malariae* a las formas causantes de las fiebres tercianas y cuartanas, respectivamente y Marchiafava y Bignami describieron *Plasmodium falciparum* como

la forma más letal y severa de malaria (Golgi, 1886; Marchiafava y Bignami, 1894). El descubrimiento de la transmisión de la malaria vía mosquitos llegaría años más tarde, tras muchas investigaciones de Patrick Manson y su discípulo Ronald Ross. Así, en 1897 Ross observó los parásitos en los estómagos de los mosquitos *Anopheles* que estudiaba y que previamente había alimentado con sangre infectada por malaria (Ross, 1897). Posteriormente, investigadores italianos liderados por Grassi describieron el ciclo completo de los parásitos productores de malaria en los mosquitos *Anopheles claviger* (Grassi et al., 1899). Finalmente, en 1948 Shortt y Garnham descubrieron los estadios hepáticos de los parásitos así como las formas latentes responsables de las reinfecciones (Shortt y Garnham, 1948). De esta manera queda patente la complejidad de la malaria, desde los distintos estadios del parásito implicados hasta la importancia del mosquito en su transmisión, así como la contribución de cientos de investigadores desde hace cientos de años para fomentar su descubrimiento y estudio.

1.1.2. Epidemiología

La prevalencia de la malaria aumentó de forma alarmante a finales del siglo XIX. En la Figura 1, se muestran los mapas correspondientes a la distribución de la malaria en 1968, años previos a la intervención por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS; en inglés *WHO, World Health Organization*) y otras instituciones para luchar contra la malaria, y 2007 (época post-intervención; Figura 1A y 1B, respectivamente). Los mapas se hicieron en base al ratio de parásitos (RP), que se define como la proporción de individuos con parásitos en sangre periférica, definiéndose 4 clases distintas: Hipoendémica ($RP < 10\%$), mesoendémica ($50\% < RP \leq 10\%$), hiperendémica ($75\% < RP \leq 50\%$) y holoendémica ($RP > 75\%$). (Hay et al., 2009; Gething et al., 2010).

De acuerdo con los datos reportados en el último informe de la *WHO*, 198 millones de casos de malaria ocurrieron en todo el mundo en el año 2013, provocando 584.000 muertes, afectando mayoritariamente a África (90%), sobre todo en África Sub-Sahariana, Sureste de Asia (7%) y la zona Este del Mediterráneo (2%), siendo un 78% de los fallecidos totales, niños menores de 5 años (WHO, 2014).

Actualmente 3.2 billones de personas están en riesgo de ser infectados por malaria y desarrollar la enfermedad (Figura 2) (*Global Malaria Mapper*, 2015).

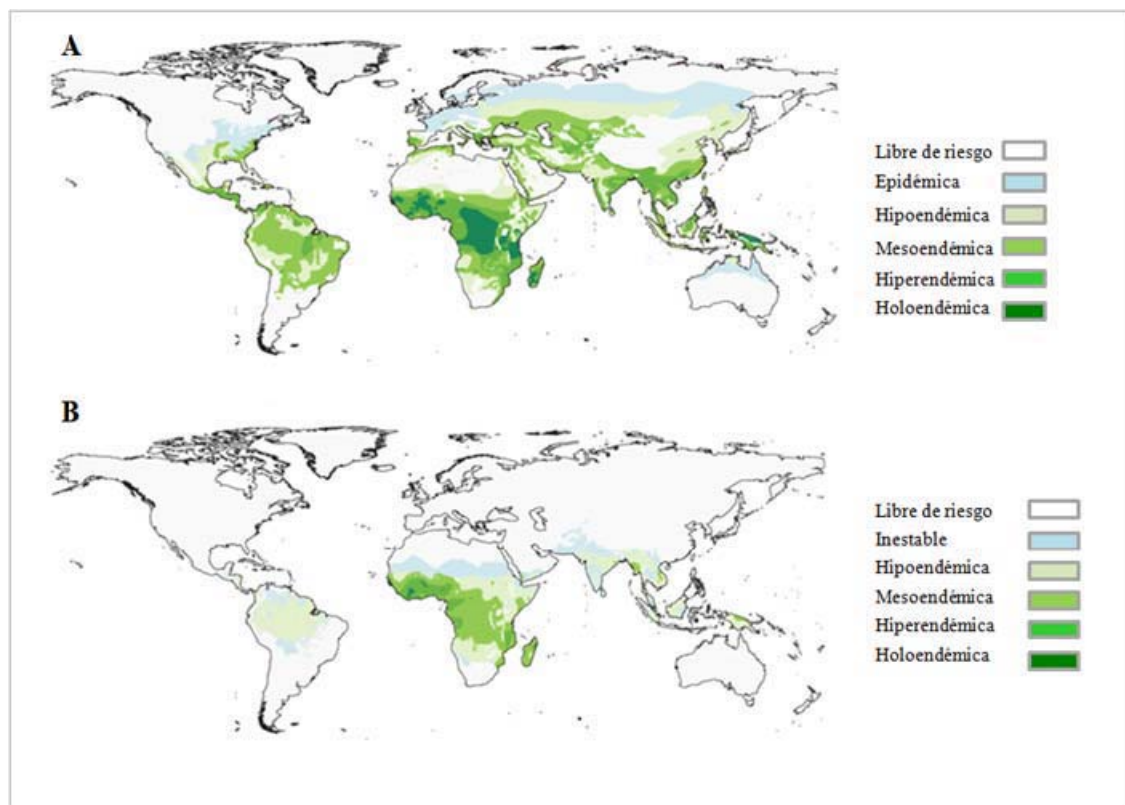


Figura 1. Mapa de la distribución mundial de la malaria (A: zonas endémicas en el año 1968; B: zonas endémicas en el año 2007) modificado de Gething et al., 2010.

P. falciparum es la especie predominante en África, así como en Nueva Guinea y Haití. *P. vivax* predomina fundamentalmente en el Norte de África, parte Este de América Central y Sudamérica. *P. ovale* se da principalmente en el Oeste de África y *P. malariae* es más común en África (Biggs y Brown, 2001; WHO, 2014).

En Septiembre del 2008, el Plan de Acción Global contra la Malaria (*GMAP-The Global Malaria Action Plan*) fue establecido con el objetivo de erradicar la malaria. La *WHO* junto con la mayoría de Gobiernos y Agencias Internacionales, financian y dan soporte a este plan cuyo objetivo en sus inicios era reducir a la mitad el número de casos de malaria en el 2010 y eliminar las muertes por malaria casi por completo en el 2015. De los 106 países que en el año 2000 continuaban transmitiendo malaria, 64 de ellos cumplían con la tendencia fijada por el *GMAP* para revertir la incidencia de la malaria (WHO, 2014). En el 2013, Azerbaiyán y Sri Lanka no reportaron ningún caso de malaria por primera vez en su historia. Cabe destacar además que 11 países (Argentina, Armenia, Egipto, Georgia, Iraq, Kirguistán, Marruecos, Omán, Paraguay, Turkmenistán y Uzbekistán) siguen manteniendo los casos de malaria a cero. Sólo 5 países con más de

1 millón de casos estimados en el 2000, conseguirán reducir en un 75% o más su nivel de incidencia de malaria. Estos países son: Afganistán, Bangladesh, Brasil, Camboya y Nueva Guinea (Figura 3).

La segunda parte del Plan de Acción Global contra la Malaria (*GMAP2*) define la estrategia y los objetivos para erradicar la malaria en los próximos 10 años (periodo del 2016-2025) (Wells et al., 2015).

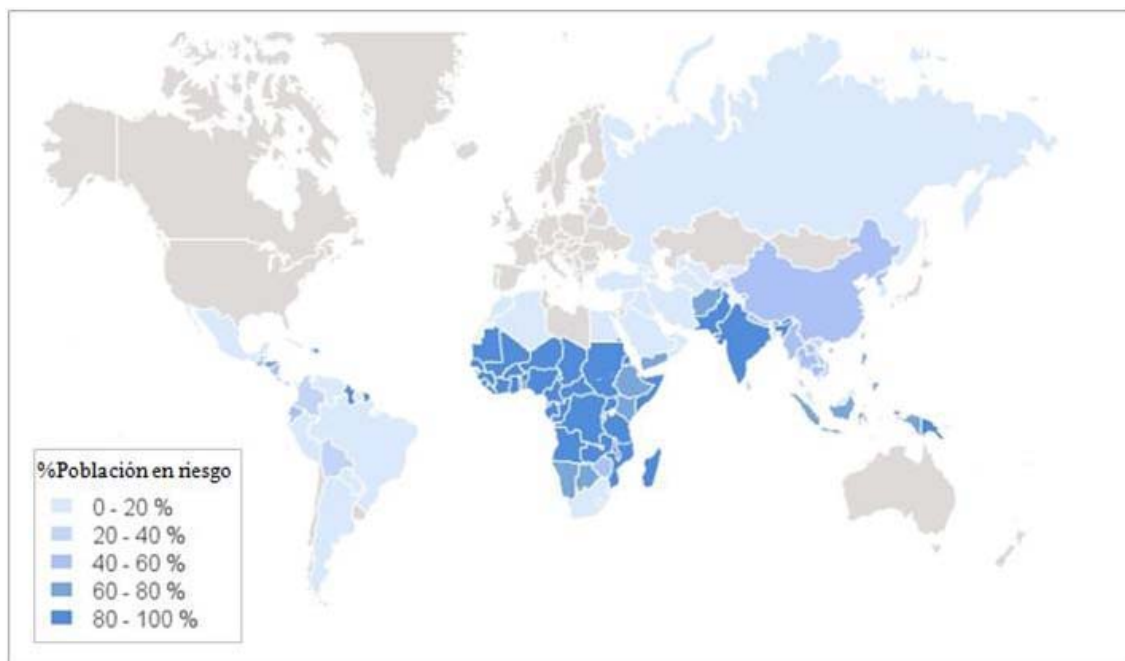


Figura 2. Mapa del porcentaje de la población mundial en riesgo de contraer malaria (*Global Malaria Mapper*, 2015).

La tendencia de disminuir los números estimados de malaria en los últimos años (2013-2015) es un hecho constatable, así se observó una reducción de los casos de malaria del 100% en Europa, 76% en América (Norte y Sur), 69% en la zona Oeste del Pacífico y 34% en África. Si la tendencia continua así, se podría alcanzar el objetivo del *GMAP2* de reducir en un 10% la incidencia de la malaria en el 2030 (Wells et al., 2015).

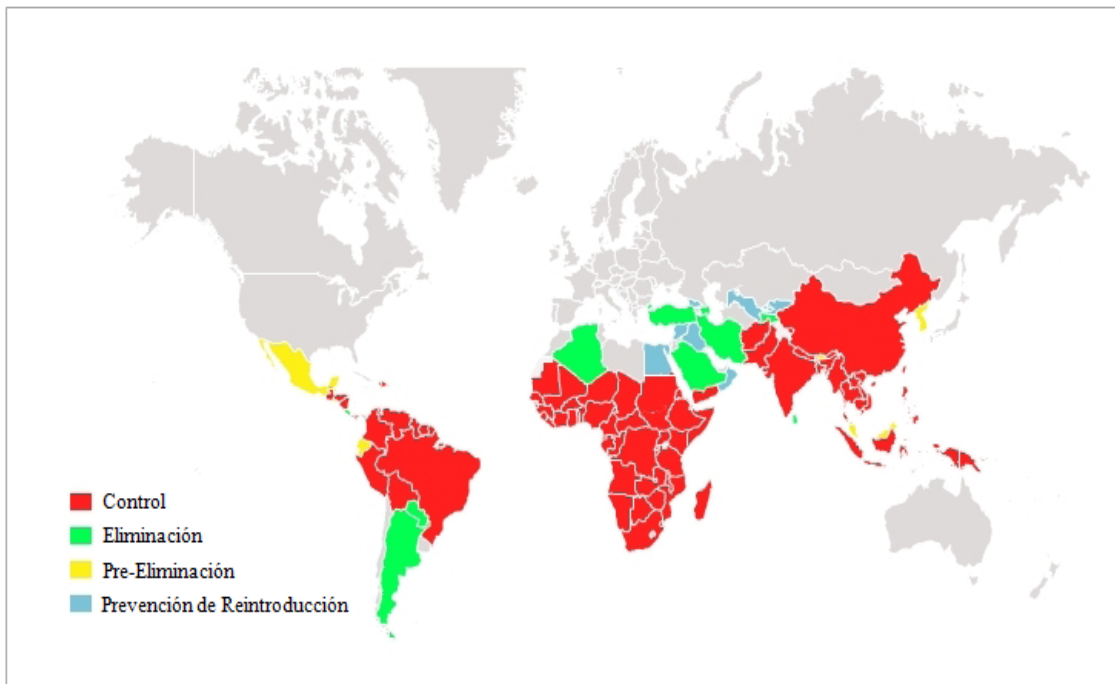


Figura 3. Mapa del plan de erradicación mundial de la malaria (*Global Malaria Mapper*, 2015).

1.1.3. Sintomatología y complicaciones de la malaria

1.1.3.1. Malaria no complicada

Se denomina periodo de incubación al periodo que transcurre desde que el mosquito pica a el hombre (inoculándole esporozoítos) hasta que aparecen los primeros síntomas, este periodo es específico para cada especie de *Plasmodium* (Tripathi et al., 2005). Es un periodo asintomático que se corresponde con la presencia del parásito en el hígado. A continuación se produce el denominado periodo prodrómico caracterizado por algunos de estos síntomas: cefalea, mialgias, fotofobia, anorexia, náuseas y vómitos, síntomas muy inespecíficos que se deben a la llegada de algún parásito a la sangre. Después de este periodo es cuando se produce el ataque primario o agudo, que consiste en accesos febriles que se producen como consecuencia de la rotura de los eritrocitos y la consecuente liberación de merozoítos a la sangre. Esta fiebre inicial suele ir acompañada de alteraciones gástricas y herpes perilabial. Tras 2-3 accesos febriles de este tipo se inician los accesos típicos que se desarrollan en tres etapas sucesivas: etapa de escalofríos, de calor y de sudor. A este proceso le sigue una fase apirética que será

interrumpida por el acceso febril siguiente que se repite aproximadamente cada 48 horas en *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum* y cada 72 horas en *P. malariae* (Markell, 1990).

1.1.3.2. Malaria complicada o severa

Todo lo mencionado anteriormente es común a todas las infecciones por *Plasmodium* pero cuando la infección es por *P. falciparum* estos fenómenos descritos son mucho más notables. Así se ven afectados seriamente multitud de órganos y son de tal gravedad que por este motivo se le conoce como paludismo pernicioso o malaria severa. Se caracteriza por hiperparasitemia, anemia severa, ictericia, fallo renal, hipertemia, fallo respiratorio por edema pulmonar, acidosis metabólica, trombocitopenia, hipoglucemia, etc. (Marsh et al., 1996; Biggs y Brown, 2001). La complicación más severa es la denominada malaria cerebral, llegando a ser fatal hasta en un 80% de los casos, especialmente en niños. Las causas que provocan la transición de una infección por malaria leve a severa aún no están claras, aunque ciertas propiedades del parásito tales como su capacidad de unión tipo citoadherencia o el secuestro de eritrocitos infectados parecen ser fundamentales (Chen et al., 2000; Miller et al., 2002). Además, debido a la madurez de los parásitos, los eritrocitos infectados se vuelven más rígidos y menos deformables, produciéndose cambios en las proteínas del parásito y de la superficie del hospedador (membrana del eritrocito). Las células infectadas se adhieren normalmente a la superficie de los eritrocitos por medio de unas protusiones o pequeñas elevaciones angulosas (*knobs*) favoreciendo además la formación de rosetas (*rosetting*) cuando se unen a eritrocitos no infectados, produciéndose este proceso en mayor medida en los casos de malaria severa (Chen et al., 2000; Miller et al., 2002). Existen muchos receptores del hospedador implicados pero sólo dos, *CD36* (*cluster of differentiation 36*) y *CSA* (*chondroitin sulphate A*) proporcionan una adherencia estable (Cooke et al., 2004). Los eritrocitos infectados quedan además secuestrados dentro de los capilares, quedando adheridos a las paredes de los vasos internos que irrigan las vísceras y los principales órganos, incluido el cerebro y sus capilares, así como la placenta (Luse y Miller, 1971; White y Ho, 1992; Biggs y Brown, 2001). Así, el secuestro de eritrocitos infectados en la placenta causa partos prematuros, bajo peso al nacer, anemia en la madre y alto índice de mortalidad en el recién nacido. Se sabe que los eritrocitos aislados de la placenta son capaces de adherirse al receptor *CSA* pero no al *CD36* (Beeson et al., 1999). Así mismo, los casos

de malaria cerebral están asociados al secuestro de parásitos en el cerebro gracias al papel del receptor *ICAM-1* (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) (Newbold et al., 1999). En estos casos los capilares cerebrales se encuentran dilatados y obstruidos por los eritrocitos infectados y es característico el acúmulo de hemozoína en el cerebro (Newton et al., 1998). Por último, cabe destacar la capacidad de *P. falciparum* de alterar los antígenos expresados en la superficie de los eritrocitos (variación antigénica) (Su et al., 1995; Biggs et al., 1991). Una de las variantes antigénicas expresadas en la superficie de las células infectadas por *P. falciparum* es *PfEMP1*: *P. falciparum erythrocyte membrane protein 1*, que es capaz de unirse a muchos receptores incluido el *CD36* y que se expresa conjuntamente con los *knobs* (Baruch et al., 1995). *PfEMP1* está codificada por los genes *var*, larga y extensa familia de genes implicada en variación antigénica y patogénesis de *P. falciparum* (Miller et al., 2002; Baruch et al., 1995; Su et al., 1995). A modo de resumen en la Figura 4 se reflejan los diversos factores (considerando propiedades propias del parásito y del hospedador, entre otros) que afectan e influyen en la gravedad de la malaria (Miller et al., 2002).

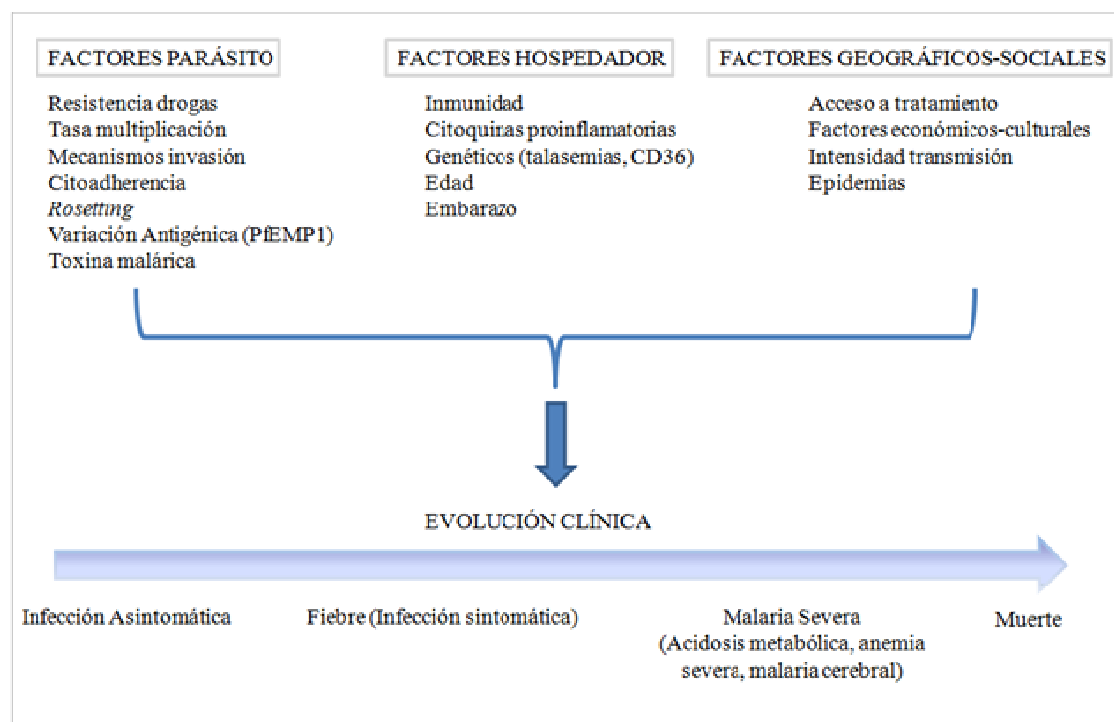


Figura 4. Factores influyentes en la evolución clínica de la malaria.

1.2. Descripción del parásito como agente infeccioso causante de la malaria

1.2.1. Taxonomía

El parásito productor de la malaria es un protozoo perteneciente al phylum *Apicomplexa*, clase *Coccidia*, género *Plasmodium*. Este género a su vez se clasifica en nueve subgéneros de los cuales tres afectan a mamíferos (hombre, primates y roedores), cuatro a pájaros y dos a reptiles (Garnham, 1966). Existen cuatro especies distintas que infectan al hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*. Las tres primeras son agentes del denominado paludismo terciano, ya que los procesos febriles se repiten cada 48 horas, mientras que *P. malariae* es la causa del paludismo cuartano (cada 72 horas). Las cuatro especies se diferencian entre sí por diversos aspectos, como la morfología, duración de las fases del ciclo vital, alteraciones que producen en los eritrocitos, etc. (Biggs y Brown, 2001). En los últimos años se han registrado casos de malaria en humanos infectados con *P. knowlesi*, especie que afecta a monos que habitan en zonas forestales del Sureste Asiático, con un ciclo eritrocítico de 24 horas y una tasa de mortalidad similar a la de *P. falciparum*, lo que ha provocado la alarma en la comunidad médica (Singh y Daneshavir, 2013). *P. falciparum* y *P. vivax* son las especies más prevalentes y representan una amenaza para la población mundial. Mientras que *P. falciparum* es el más letal, *P. vivax* es el más distribuido mundialmente debido a su capacidad de infectar a los mosquitos *Anopheles* incluso a bajas temperaturas (WHO, 2014). Finalmente, *P. ovale* y *P. malariae* se caracterizan por producir procesos leves y típicamente se observan en co-infección con *P. falciparum* y/o *P. vivax* (Moreno y Joyner, 2015). Las formas latentes que quedan en el hígado (hipnozoítos) son propias de *P. vivax* y *P. ovale*. Los hipnozoítos pueden activarse meses e incluso años después provocando una recaída de la enfermedad. Durante este tiempo permiten sobrevivir al parásito y convertirlo en un potencial reservorio de la enfermedad (Moreno y Joyner, 2015).

1.2.2. Morfología del parásito

Los miembros del género *Plasmodium* son parásitos intracelulares obligados, que invaden a las células del hospedador, crecen en su interior y se dividen hasta que lisan las células del hospedador como consecuencia de su replicación y de la aparición de nuevos parásitos, que necesitan reinvadir nuevas células del hospedador para

sobrevivir (Morrisette y Sibley, 2002). Siendo además capaces de diferenciarse en formas que pueden invadir distintos tejidos y hospedadores e incluso la infección en otros organismos, como los mosquitos, convirtiéndose éstos en vectores que transmiten los parásitos de un hospedador a otro (Aikawa, 1988; Morrisette y Sibley, 2002). Los parásitos se caracterizan morfológicamente por la presencia del núcleo (n), complejo apical (ap), integrado éste por anillos polares, roptrias (r), micronemas, prominencia apical, gránulos densos (d) y microtúbulos subpeliculares. Dicho complejo apical guarda estrecha relación con la invasión celular e inicio de la división ya que se trata fundamentalmente de vesículas membranosas que liberan su contenido durante la invasión, provocando cambios en la forma y composición de la membrana del eritrocito invadido, desde el merozoíto o forma invasiva (Figura 5A), hasta la forma más madura o esquizonte (Figura 5D), pasando por los estadios de maduración intermedios: anillos (Figura 5B) y trofozoítos (Figura 5C) (Bannister et al., 2000).

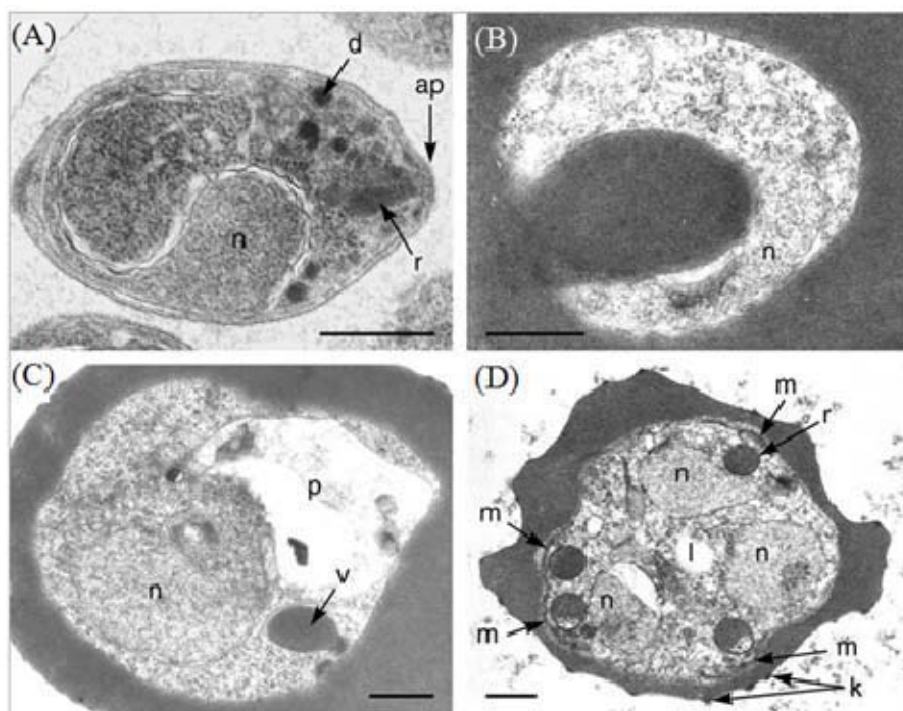


Figura 5. Microscopía electrónica de los estadios eritrocíticos asexuales de *P. falciparum*. (Escala 0.5µm; Modificado de Bannister et al., 2000). (Figura 5A: merozoíto, observándose su complejo apical (ap), con los gránulos densos (d) y roptrias (r); Figura 5B: anillo, observándose el núcleo (n) rodeado de ribosomas y algo de retículo endoplásmico; Figura 5C: trofozoíto, donde se aprecia el núcleo (n), la vacuola pigmentaria (p) y el citostoma (v) con la vacuola alimentaria formándose; Figura 5D: esquizonte, que se caracteriza por tener en su interior un número de núcleos correspondientes a los merozoítos (m) que están formándose que ya poseen roptrias redondeadas (r) alrededor de su perímetro. La vacuola lipídica (l) se observa dispuesta centralmente y es característica la presencia de *knobs* (k) e irregularidades en la superficie del eritrocito).

Los drásticos cambios morfológicos que sufre el parásito durante todo su ciclo vital, reflejan su gran capacidad para desarrollarse de una forma continua y dinámica durante todo su ciclo biológico.

1.2.3. Ciclo biológico

Plasmodium requiere para realizar su ciclo vital, dos hospedadores: el hombre y el mosquito *Anopheles* hembra. En el mosquito se realiza la reproducción sexual del parásito, siendo el mosquito el hospedador definitivo; mientras que en el hombre se lleva a cabo la multiplicación asexual, considerándose éste el hospedador intermediario (Figura 6).

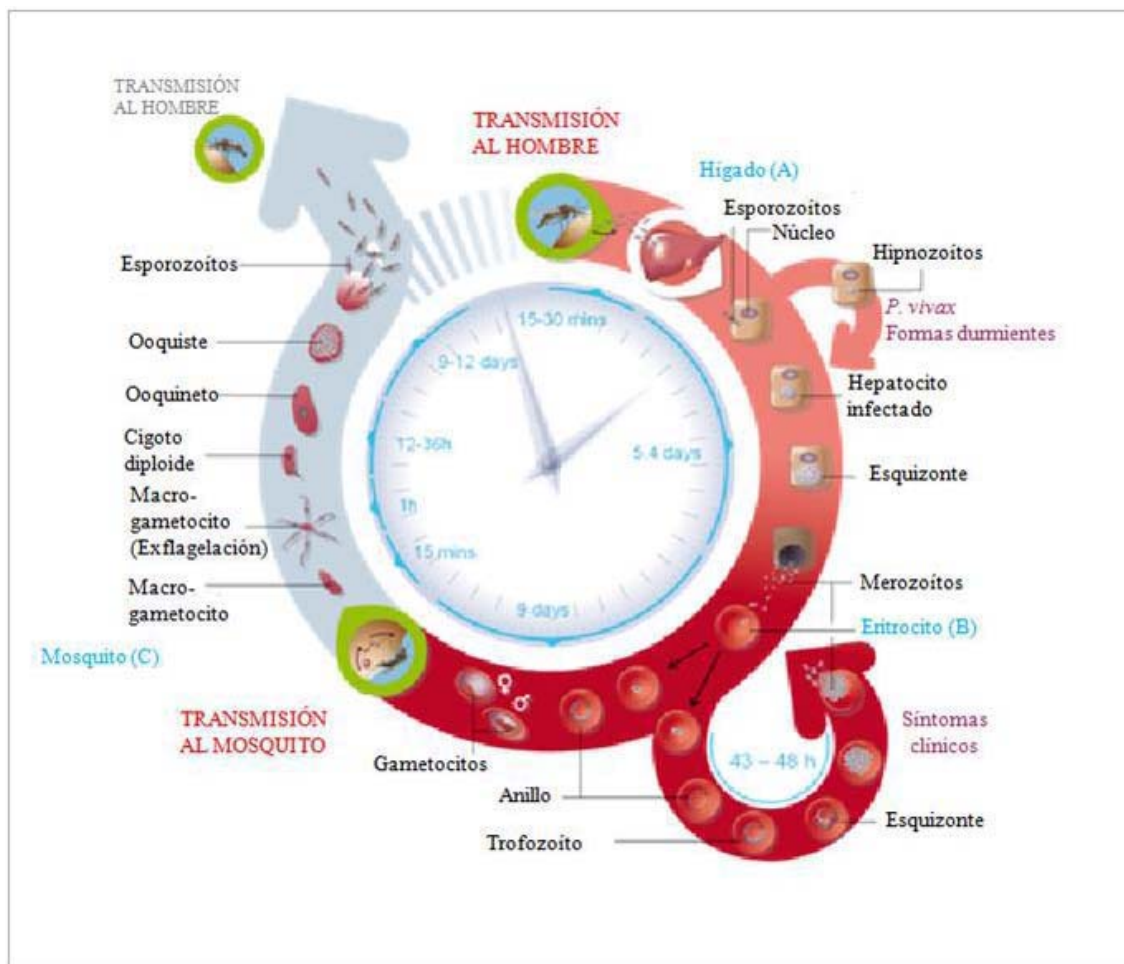


Figura 6. Esquema del ciclo de vida del parásito que produce la malaria (Fuente: *Malaria for Medicines Venture, MMV*).

1.2.3.1. Fase Asexual

El hombre se infecta, de modo natural, cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* infectado, le pica para succionar sangre. Al picar introduce junto con la saliva miles de esporozoítos que pasan a la corriente sanguínea, donde aproximadamente circulan durante una hora hasta que pasan a invadir los hepatocitos (Figura 6A), empezando así la fase denominada, pre-eritrocítica o tisular o hepática (Wernsdorfer y McGregor, 1988; Tripathi et al., 2005). Es durante esta fase cuando se lleva a cabo el proceso conocido como esquizogonia exoeritrocítica primaria: El esporozoíto en el hepatocito, se transforma en trofozoíto y después en esquizonte que tras su ruptura libera un gran número de merozoítos que pasarán a la sangre. Este proceso puede durar entre 5-7 días según la especie. En las infecciones por *P. vivax* y *P. ovale* algunos de los esporozoítos pueden permanecer en el citoplasma del hepatocito sin evolucionar, recibiendo el nombre de hipnozoítos. Pasado un tiempo pueden entrar en actividad y realizar una esquizogonia exoeritrocítica secundaria, causando las llamadas recidivas o recaídas (Wernsdorfer y McGregor, 1988; Tripathi et al., 2005). Cuando los merozoítos son liberados a la sangre es cuando se inicia la fase eritrocítica (Figura 6B). Este proceso conlleva una serie de cambios sustanciales tanto en el parásito como en el propio eritrocito. El parásito descarga el contenido de sus vesículas membranosas (orgánulos característicos: roptrias, micronemas y gránulos densos) durante la invasión y provoca un cambio en la composición y forma de la membrana del eritrocito invadido. Así la secreción de los micronemas y roptrias es esencial para el ensamblaje del merozoíto (por su extremo apical) al eritrocito y para la consiguiente formación en la superficie del eritrocito de una cavidad invasiva que envuelve inicialmente al merozoíto, para finalmente dar lugar a la formación de la vacuola parasitófora (Bannister et al., 2000). En ella, los gránulos densos liberan su contenido, aumentando el área de esta membrana y facilitando el cambio del parásito a una forma redondeada con una vacuola central que desplaza al núcleo y citoplasma a la periferia, adquiriendo una forma de anillo característica (Figura 7A); a medida que el parásito madura, pierde el aspecto de anillo y adquiere una forma ameboide, al tiempo que la gran vacuola se va reduciendo hasta desaparecer (trofozoíto; Figura 7B) (Markell et al., 1990; Bannister et al., 2000).

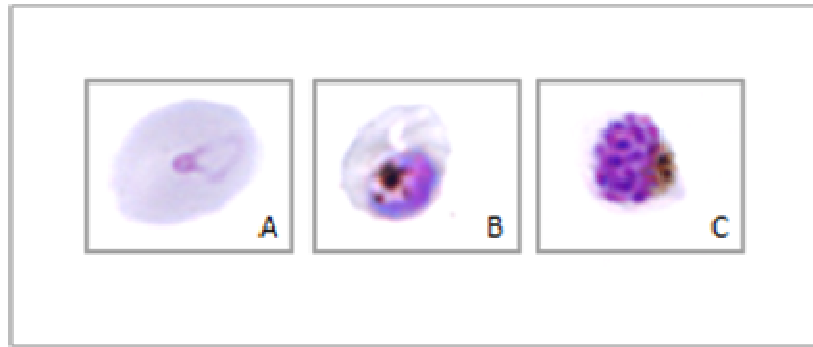


Figura 7. Microscopía óptica de fases eritrocíticas asexuales (A: anillo; B: trofozoíto; C: esquizonte).

Durante su crecimiento, el parásito se alimenta de la hemoglobina del eritrocito liberando hemozoína como consecuencia del metabolismo de la hemoglobina (Francis et al., 1997; Pagola et al., 2000). La hemozoína se acumula en el citoplasma del parásito, aumentando su cantidad a medida que prosigue el desarrollo del mismo. A su vez, el eritrocito sufre una serie de modificaciones, destacando entre otras, las alteraciones en su pared, que reciben distintos nombres según la especie: Puntos de *Schüffner* en infecciones por *P. vivax* y *P. ovale*, manchas de *Maurer* en infecciones por *P. falciparum* y manchas de *Zieman* en las infecciones por *P. malariae* (Markell et al., 1990). Cuando el trofozoíto es maduro comienza la esquizogonia eritrocítica que da lugar a un esquizonte (Figura 7C) que puede llegar a contener entre 24-32 merozoítos, según la especie. Cuando se produce la rotura del esquizonte y posterior liberación de los merozoítos al torrente circulatorio, como consecuencia de la lisis del eritrocito, es cuando se producen los síntomas típicos de la malaria, liberándose a su vez toxinas del parásito que provocan en el hospedador la liberación de citoquinas, como por ejemplo el factor de necrosis tumoral (Biggs y Brown, 2001; Kwiatkowski et al., 1993; Miller et al., 1994). Muchos de los merozoítos liberados son destruidos por las células del sistema inmune del hospedador, pero el resto es capaz de invadir nuevos eritrocitos, produciéndose así una nueva esquizogonia (Markell et al., 1990). Este ciclo se repite aproximadamente cada 48 horas en *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum* y cada 72 horas en *P. malariae*. A medida que la infección progresa, hay una cierta tendencia de que los ciclos replicativos se conviertan en sincrónicos (predominancia de una sola forma). En algunos casos, la parasitemia puede llegar a aumentar del orden de 10 veces en 48 horas (Biggs y Brown, 2001). Después de 2 ó 3 esquizogonias eritrocíticas, algunos merozoítos (determinados genéticamente) inician el proceso de la gametocitogénesis y

en lugar de transformarse en esquizontes, se transforman en gametocitos femeninos (macrogametocitos) y masculinos (microgametocitos), (Figura 8A y 8B, respectivamente) estos gametocitos son la forma infectante para los mosquitos y no producen síntomas en el hombre. La morfología de los gametocitos (estadios I-V; Figura 8) varía según la especie, entre oval y redondeado, y cuando están maduros contienen un solo núcleo que es compacto y excéntrico en los macrogametocitos y poco compacto y central en los microgametocitos. Estas formas se mantienen en la sangre hasta que el parásito es destruido al cabo de meses o años, o el hospedador muere (Carter y Miller, 1979).

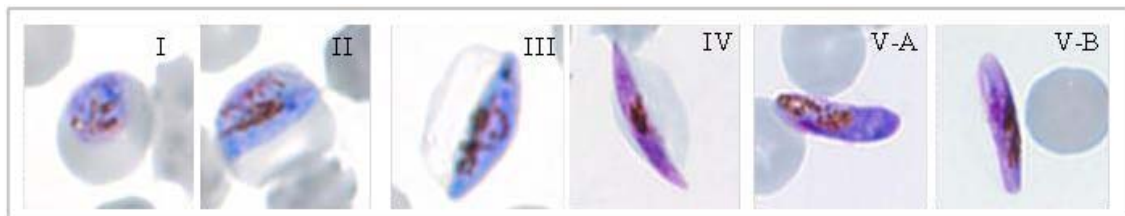


Figura 8. Morfología de los distintos estadios de gametocitos de *P. falciparum*. (Estadios de maduración: I, II, III, IV y V; A: macrogametocito, B: microgametocito).

1.2.3.2. Fase Sexual

Cuando el vector invertebrado, mosquito hembra del género *Anopheles*, ingiere sangre de un individuo infectado, toma eritrocitos con gametocitos (Figura 6C). En el estómago del mosquito, los macro y microgametocitos quedan libres por digestión del eritrocito y se inicia la formación de los gametos. Los gametocitos femeninos se transforman sin ninguna división en gametos femeninos (macrogametos), únicamente sufren un cambio morfológico a consecuencia del cual adquieren una forma redondeada. Los gametocitos masculinos dividen sus núcleos varias veces para dar 6-8 núcleos que se asocian a parte del citoplasma y a un flagelo, formándose otros tantos gametos masculinos (microgametos). Éstos tienen una vida muy corta y deben encontrar un microgameto para fecundarlo. Una vez fecundado, el cigoto diploide formado, se transforma en ooquinetto que atraviesa el epitelio estomacal y se localiza en la lámina basal donde se transforma en ooquiste. Tras varias divisiones mitóticas y una meiosis se forman en cada ooquiste miles de esporozoítos, que rompen la pared ooquistica y migran a las glándulas salivares donde podrán de nuevo infectar a otro hospedador humano tras la picadura del mosquito infectado (Figura 6) (Biggs y Brown, 2001).

1.2.4. Genómica

En el 2002, se publicó el genoma completo secuenciado de *P. falciparum* y *P. yoelii* (especie que infecta a ratones) (Gardner et al., 2002). El genoma de *P. falciparum* consta de aproximadamente 25 Mb, siendo un genoma haploide con 14 cromosomas y unos 5.000 genes. La información obtenida a partir de secuencias adicionales, permitieron descifrar a su vez el genoma mitocondrial (6 kb) y las 35 kb del ADN circular que se localiza en el orgánulo específico del parásito denominado apicoplasto (Gardner et al., 2002; Hoffman et al., 2002). Una de las peculiaridades del genoma de *P. falciparum* es un contenido medio de guaninas-citosinas (GC) del 18% y sobre todo su alto contenido (80%) en adenosina y timina (AT) en su ADN, que le confiere cierta inestabilidad y problemas de ensamblaje y clonaje (Biggs y Brown, 2001; Hoffman et al., 2002).

La malaria implica en total 3 genomas eucarióticos, el del parásito, el del vector y el del hombre. El genoma del vector *Anopheles gambiae* es un genoma diploide de 280 Mb, con dos cromosomas autosómicos además del genoma mitocondrial. Codifica para aproximadamente unas 13.000 proteínas. Por su parte el complejo genoma humano de 2.900 Mb (diploide) consta de 22 cromosomas autosómicos además del genoma mitocondrial y en total codifica para 21.714 proteínas (Hoffman et al., 2002; *The Malaria Genomic Epidemiology Network*, Achidi et al., 2008).

Este importante proyecto se llevo a cabo entre un consorcio de fundaciones y centros específicos de genómica creado en el año 1966 (Hoffman et al., 2002). En el 2005 se estableció la plataforma *MalariaGEN* (*The Malaria Genomic Epidemiology Network*) con el firme propósito de descubrir mecanismos de inmunidad que protegieran de la malaria, combinando la información de los datos de los estudios epidemiológicos llevados a cabo en regiones endémicas, con la información obtenida del análisis a gran escala de la variación génica que se produce en las poblaciones de dichas zonas endémicas (*The Malaria Genomic Epidemiology Network*, Achidi et al., 2008). En la Tabla 1, se resumen los principales proyectos que se están llevando a cabo por dicho consorcio.

Queda de nuevo patente la complejidad de la malaria y la necesidad de una investigación constante, novedosa y colaborativa entre todos los grupos de investigación (tanto de zonas endémicas como de zonas no afectadas) para poder combatirla.

Tabla 1. Proyectos del consorcio MalariaGEN (*: Lugar de estudio).

Proyecto	Principales Resultados
Análisis de variantes génicas asociadas a resistencias o susceptibilidad a malaria severa	Más de 10.000 casos estudiados Más de 10.000 controles étnicos asociados a variantes génicas de malaria severa (*) Burkina Faso, Camerún, Gambia, Ghana, Kenia, Malawi, Mali, Nigeria, Nueva Guinea, Tanzania y Vietnam
Análisis de los factores genéticos que determinan la respuesta de anticuerpos anti-malaria	Ensayos desarrollados y estandarizados para anticuerpos específicos para antígenos maláricos (*) Burkina Faso, Kenia, Mali, Senegal, Sri Lanka, Sudán y Tanzania
Análisis de variación génica en poblaciones endémicas de malaria	Se ha establecido un almacén de ADN para permitir estudios de variación genómica en distintas zonas endémicas (*) Burkina Faso, Camerún, Gambia, Ghana, Kenia, Mali, Nigeria, Nueva Guinea, Sudán, Tanzania y Vietnam
Estudios genéticos para asociar rasgos cuantitativos en malaria	Colaboración establecida para compartir los datos de estudios genéticos con los distintos factores que afectan a la infección por malaria (*) Ghana, Senegal, Tailandia

1.3. Estrategias para erradicar la malaria

En el año 1997 las prioridades para establecer un programa multidisciplinar en la investigación y lucha contra la malaria fueron establecidas por los investigadores de África bajo la supervisión de una nueva organización: *Multilateral Initiative on Malaria (MIM)*. Este proyecto fue enseguida respaldado por distintas instituciones internacionales como *Wellcome Trust*, *The Gates Foundation*, *WHO*, *UNICEF (United Nations International Children's Emergency Fund)*, *Malaria for Medicines Venture*, creándose la iniciativa conocida como *Roll Back Malaria (RBM)* que unifica a todos los

grupos interesados en el control y erradicación de la malaria (*Roll Back Malaria Partnership*, 2008; Biggs y Brown, 2001; Greenwood y Mutabingwa, 2002). De esta manera se estableció el *GMAP* y “La estrategia técnica global contra la malaria” que definen los objetivos hasta el año 2025. Las principales estrategias establecidas fueron: control del vector (uso de insecticidas como el 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano (*DDT*)) (Roberts et al., 2000); interrupción del contacto entre el hombre y el vector (fomentar uso de mosquiteras tratadas con insecticidas (*Insecticide-treated net, ITN*), por ejemplo con permetrina) (Shretta, 1998; Armstrong et al., 2001); tratamiento intermitente en embarazadas y niños (combinación sulfadoxina-pirimetamina) (Shulman et al., 1999; Schellenber et al., 2001); Mejorar el acceso y cumplimiento de los tratamientos en zonas endémicas, entrenando a las madres y farmacéuticos fundamentalmente (Kidane y Morrow, 2000; Marsh et al., 1999); definición del “antimalárico perfecto” (*SERCaP: single exposure, radical cure and profilaxis*) (Alonso et al., 2011); uso de antimaláricos en combinación, para aumentar su eficacia y reducir la aparición de resistencias, siendo uno de ellos artemisinina (*ACTs: Artemisinin combination therapies*) (Bloland et al., 2000; Bosman y Mendis, 2007); bloquear la transmisión (actuando sobre las formas sexuales del parásito o evitando su desarrollo en el mosquito) (Steketee y Ter Kuile, 2014); eliminar las formas durmientes de *P. vivax* y *P. ovale* evitando así las recaídas (mejorando la bioseguridad de la primaquina, que actúa sobre los hipnozoítos salvo en pacientes con deficiencia en *G6PD* (glucosa 6-P deshidrogenasa) donde induce hemólisis) (Bolchoz et al., 2001) y el desarrollo de vacunas y nuevos antimaláricos (Wells et al., 2015).

1.3.1. Vacunas

El complejo ciclo de vida del parásito así como los mecanismos que le confieren inmunidad son los principales obstáculos para el desarrollo de una vacuna eficaz contra la malaria. La *WHO* estableció las condiciones de desarrollo para una vacuna eficaz y segura contra *P. falciparum* y *P. vivax* (*Malaria Vaccine Technology Roadmap*) (WHO, 2013). Muchos han sido los esfuerzos desde entonces para conseguir dicho objetivo, centrándose en los distintos estadios del parásito (fase pre-eritrocítica, eritrocítica) así como en su transmisión (Moreno y Joyner, 2015). Inicialmente se usaban esporozoítos atenuados (*PfSPZ: sporozoites of P. falciparum*) que proporcionaban una mayor protección que la propia adquirida por una infección natural (Epstein et al., 2011;

Hoffman et al., 2002). Actualmente las principales vacunas en desarrollo se basan en distintos componentes antigénicos de distintas proteínas del parásito como las proteínas de superficie del esporozoíto: *CSP* (*circumsporozoite protein*), proteínas de adhesión relacionadas con epítomos múltiples de tromboespondina (del inglés *Me-TRAP*: *multiple epitope thrombospondin-related adhesion protein*), proteínas transversales de células de ooquistos y esporozoítos (*CeITOS*, *cell-traversal protein for ookinetes and sporozoites*), proteínas de superficie de merozoítos (*MSP-1*, *MSP3*; *merozoite surface protein*), proteínas expresadas en merozoítos y esporozoítos como *AMA-1* (*Apical Membrane Antigen*), etc. Las vacunas implicadas en bloquear la transmisión se basan en antígenos expresados antes de la fertilización (gametocitos, *Pfs230*, *surface protein of gametes*) o después de la fertilización (cigotos/ooquistos, *Pfs25*, *surface protein of zygote and ookinete*). En el caso de *P. vivax* las más avanzadas son las relacionadas con *CSP* o con las proteínas de unión tipo *Duffy* (*DBP*, *Duffy-binding protein*). En algunos casos, para potenciar la respuesta de células T se han usado adenovirus recombinantes como vectores (*Ad5*, *ad35*) u otros virus atenuados (*MVA*: Ankara virus), (Tabla 2).

Tabla 2. Candidatos de vacunas contra *P. falciparum* (Pf) y *P. vivax* (Pv).

PRE-ERITROCÍTICAS	ERITROCÍTICAS	BLOQUEANTES TRANSMISIÓN
<i>RTS,S/AS01A</i> <i>PfME-TRAP (ChAd63/MVA)</i> <i>PfCSP (ChAd63/MVA)</i> <i>PfSPZ (iSPZ, GAS, CPS)</i> <i>PfCSP (DNA/Ad5)</i> <i>PfCSP + PfAMA-1(Ad5)</i> <i>PfCeITOS</i> <i>PfCSP (Ad35)</i> <i>PvCSP (VMP001/AS01B)</i>	<i>PfMSP1 – PfAMA-1 (ChAd63/MVA)</i> <i>PfAMA-1/AS02A (FMP2.1)</i> <i>PfAMA-1 (DiCo)</i> <i>PfGLURP/PfMSP3 (GMZ2)</i> <i>PvDBP (ChAd63/MVA)</i>	<i>Pfs25/EPA</i> <i>Pfs230/EPA</i>

Actualmente la vacuna más avanzada (*Mosquirix*), fue presentada en la Agencia Europea del Medicamento para su valoración (2014). Conocida también por el nombre de RTS,S (porque el antígeno se expresa en una partícula tipo viral conocida como RTS,S) ha superado la fase III de ensayos clínicos recibiendo además una opinión positiva por parte de la Agencia Europea del Medicamento. La vacuna se basa en componentes antigénicos de proteínas de superficie de esporozoítos de *P. falciparum* (*CSP*). El antígeno recombinante de la vacuna incluye una región repetida (R) y la

región carboxilo-terminal completa de la *CSP*, que tiene distintos epítomos de células T (T) fusionados con antígenos de superficie de la hepatitis B (S). Para aumentar la reactividad celular está formulada en el adyuvante (*AS01*) que contiene una emulsión de aceite en agua que incorpora una mezcla de monofosforil-lípidosA y QS-21 (saponina) (Stoute et al., 1997; Moreno y Joyner, 2015; Wells et al., 2015). Su eficacia es del 55% en niños y de un 33% en bebés de 18 meses (RTS,S *Clinical Trials Partnership*, 2014). Aunque su eficacia y durabilidad no es óptima, la información que ha proporcionado ha contribuido al desarrollo de nuevas vacunas que junto con la aplicación de nuevas tecnologías (proteómica, metabolómica, genómica funcional, etc.) ayudarán a conseguir el objetivo fijado de obtener una vacuna para la malaria con un 75% de eficacia para el año 2030 (WHO, 2013; Moreno y Joyner, 2015).

1.3.2. Antimaláricos-Resistencias

Durante la última década los antimaláricos han sufrido una gran transformación debido en parte al desarrollo de resistencias a los antimaláricos comerciales y a la aparición de nuevas entidades químicas (Tabla 3). El uso inapropiado de algunos antimaláricos durante la mitad del siglo XIX produjo el desarrollo de resistencias, así en 1970 la resistencia a cloroquina (CQ) estaba documentada en todas las regiones afectadas por malaria (Wellems y Plowe, 2001), lo mismo ocurría en 1990 para la combinación sulfadoxina-pirimetamina y para la mefloquina (White, 1998; Gatton et al., 2004; Vinayak et al., 2010). Para combatir esta situación la *WHO* estableció como tratamiento prioritario las terapias de combinación con artemisinina (del inglés, *Artemisinin-based combination therapy*, *ACTs*) en un tratamiento único de 3 días (Bloland et al., 2000, WHO, 2010). La artemisinina y sus derivados poseen una corta vida media, su principio activo, dihidroartemisinina (DHA), necesita de un tratamiento largo (5-7 días) y por su mecanismo de acción (rápida acción en formas asexuales y gametocida) son los candidatos idóneos para una terapia en combinación con antimaláricos de larga vida media, para así reducir el tiempo de tratamiento y garantizar el cumplimiento del mismo (WHO, 2010). Así, desde el año 2008 existen 5 *ACTs* aprobadas por la *WHO*: artemeter-lumefantrina, amodiaquina-artesunato, DHA-piperaquina, pironaridina-artesunato y artesunato-mefloquina (Brockman et al., 2000; Ubben y Poll, 2013). Si bien, la aparición de resistencias a artemisinina en el Sureste de Camboya (Dondorp et al., 2009; WHO, 2010) amenazan los programas de control y erradicación de la malaria.

Tabla 3. Descripción de los principales antimaláricos disponibles (*:resistencia; **: uso en combinación).

DROGAS	MECANISMO DE ACCIÓN	LIMITACIONES
QUINOLINAS Quinina <i>(Chinchona bark)</i> Cloroquina (CQ) Amodiaquina Mefloquina Halofantrina Primaquina	Inhibición polimerización (hemo) Gametocida Bloqueo transmisión Formas hepáticas (hipnozoítos) Prevención recaídas	Toxicidad/Cumplimiento Tratamiento /Resistencia Resistencias (1950-Camboya; 1970-Global; <i>PfCRT</i>) Toxicidad/Resistencia Toxicidad: NeuroPsiquiatría/Resistencia/Costes Toxicidad: Cardíaca/Resistencia/Costes Toxicidad (Hemólisis- Deficiencia G6PD) <i>PfCRT: chloroquine resistance transporter</i>
ARTEMISININA <i>Artemisia annua</i> Artemeter Arte-eter Artesunato	Principio activo Dihidroartemisinina (DHA) Acción rápida Gametocida	Vida media corta Tratamiento largo (5-7 días, no combinación) Cumplimiento Tratamiento Uso en ACTs Resistencias (Costa Este Camboya; K13Propeller)
ANTIFOLATOS Proguanil* (PG) Pirimetamina (P) Sulfadoxina (S) Dapsone (Sulfona) (D) <i>Fansidar (P-S)**</i> <i>Maloprim (P-D)**</i>	Inhibición síntesis pirimidinas Inhibidor Dihidrofoloreductasa (DHFR)	*Resistencia (uso en combinación**) Proguanil-CQ: Eficaz en África SubSahariana Aumento resistencia (Sureste Asiático) Toxicidad (Síndrome Stevens-Johnson) Tratamiento intermitente embarazadas, niños Usado en combinación con CQ Toxicidad (agranulocitosis) Desuso
ATOVAQUONA (A)* <i>Malarone (A-PG)**</i>	Inhibidor transporte e ⁻ mitocondrial	*Resistencia (uso en combinación**) Sinergia, alto coste, profilaxis viajeros
ANTIBIÓTICOS Doxiciclina Tetraciclina Clindamicina	Inhibición crecimiento parásito Inhibición síntesis proteínas Apicoplasto	Combinación Tetraciclina-Quinina (Sureste Asiático) Doxiciclina-Quinina (Sureste Asiático) Uso limitado en África (No apto niños < 8 años)

1.3.3. Desarrollo de nuevos antimaláricos

En los últimos años debido al aumento de las *ACTs* y a su origen natural (*Artemisia annua*), muchos esfuerzos han estado centrados en obtener endoperóxidos sintéticos, como por ejemplo, *Arterolane* (OZ277) y *Artefenomel* (OZ439), simplificando su síntesis para reducir su coste y mejorando a su vez sus propiedades farmacocinéticas así como su perfil toxicológico (Kopetzki et al., 2013; Biamonte et al., 2013). Por su parte, la industria farmacéutica ha seguido fundamentalmente dos aproximaciones para el descubrimiento de nuevos antimaláricos. Por un lado, estrategias para la identificación de moléculas con efectos biológicos particulares, en ensayos celulares o modelos animales (*screening* fenotípicos). Dichas moléculas suelen proceder fundamentalmente de productos naturales (Wells, 2013) o del uso de nuevos heteroátomos (Zhang et al., 2011). En este sentido también se ha buscado simular las actividades biológicas propias del parásito (*screening* biológico), para identificar compuestos que actúen a ese nivel, como por ejemplo, bloqueando la transmisión con compuestos que maten los gametocitos o actuando sobre las formas durmientes de los estadios hepáticos. Y por otro lado, la identificación de nuevas dianas terapéuticas, gracias a los avances tecnológicos (biología molecular, revolución genómica, *OMICS*, etc.) así como a las campañas de cribados automatizados de alto rendimiento (*HTS*, por sus siglas en inglés) (Gamo et al., 2010; Meister et al., 2011; Guiguemde et al., 2010) (Figura 9).

Para llevar a cabo todas estas aproximaciones es necesario establecer las condiciones óptimas del cultivo *in vitro* del parásito. En 1976 Trager y Jensen (Trager y Jensen, 1976) describieron las condiciones para el cultivo continuo de las formas eritrocíticas de *P. falciparum*.

Desde entonces muchos laboratorios y grupos de investigación han desarrollado métodos para el cultivo del parásito, tanto de las formas asexuales (trabajando con distintas cepas adaptadas al laboratorio, tanto en cultivo asincrónico como sincrónico) y sexuales, así como de los estadios propios que se dan en el mosquito.

Establecidos los distintos estadios del parásito, el siguiente paso es caracterizar las moléculas seleccionadas como posibles antimaláricos, usando para ello distintos ensayos que permiten así determinar por ejemplo, su potencia (ensayos de IC_{50}

(concentración que inhibe al 50% de los parásitos), su actividad específica de forma (ensayos de especificidad de forma), velocidad de acción, recrudescencia o su posible uso en combinación con antimaláricos comerciales.

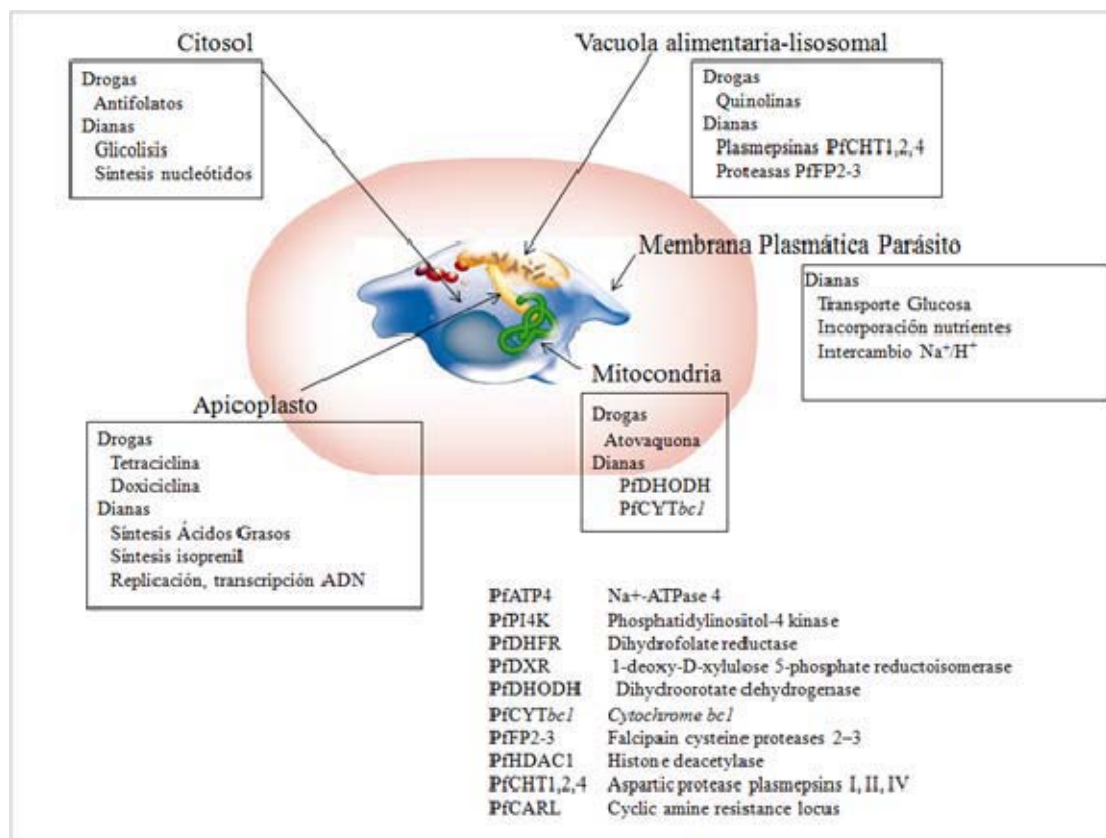


Figura 9. Principales orgánulos del parásito asociados a nuevas drogas y dianas (Lista de las dianas recientemente identificadas (abajo); Modificado de Ridley, 2002).

El punto de partida de esta Tesis Doctoral fue el establecimiento de las condiciones óptimas del cultivo *in vitro* de formas asexuales y sexuales de *P. falciparum* en nuestro laboratorio, para el posterior estudio de una nueva familia de antimaláricos 4(1H)-piridonas, como potentes inhibidores selectivos de la actividad en la cadena respiratoria mitocondrial del parásito.

OBJETIVOS

El centro de investigación y desarrollo para enfermedades de los países en desarrollo (*Diseases of Developing World, DDW*) de la farmacéutica GlaxoSmithKline (*GSK*) está dedicado al descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos contra la malaria, tuberculosis, leishmaniasis y enfermedad de Chagas.

En el año 2003 se estableció una colaboración con la organización *Malaria for Medicines Venture (MMV)* para el desarrollo de nuevos antimaláricos. Uno de los proyectos financiados por la *MMV* tenía como objetivo la búsqueda de inhibidores selectivos de la función mitocondrial de *Plasmodium falciparum*. La caracterización biológica de esta familia de antimaláricos denominados 4(1H)-piridonas, es el objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

Para poder caracterizar estos potenciales antimaláricos era indispensable establecer las condiciones óptimas del cultivo *in vitro* del parásito productor de la forma más letal de malaria (*P. falciparum*). De esta manera se establecieron los principales objetivos:

1. Obtención *in vitro* de formas eritrocíticas, asexuales y sexuales de *P. falciparum*. Para llevar a cabo este primer objetivo general, se definieron los siguientes objetivos específicos:

1.1. Puesta a punto del cultivo de distintas cepas adaptadas al laboratorio con distintos perfiles de sensibilidad a antimaláricos comerciales ya conocidos.

1.2. Cultivo de las formas asexuales de *P. falciparum* (anillos, trofozoítos y esquizontes).

1.3. Sincronización del cultivo, comparando para ello los distintos métodos de sincronización disponibles (sorbitol, plasmion) y estableciendo un método óptimo de sincronización que permitiera obtener cultivos sincrónicos en formas jóvenes (anillos) y maduras (trofozoítos y esquizontes).

1.4. Obtención de un cultivo altamente sincrónico en el tiempo, que permitiera caracterizar las distintas formas eritrocíticas asexuales, definiendo además su tiempo de obtención específico, dentro de las 48 horas del ciclo eritrocítico asexual del parásito. Este tipo de cultivo permitirá realizar estudios de especificidad de forma.

1.5. Obtención de gametocitos o formas sexuales del parásito. Para ello se consideraron los distintos factores que inducen e influyen en la

gametocitogénesis, proceso que en condiciones normales no se da en el laboratorio, para obtener los cinco estadios propios de los gametocitos, según su grado de madurez.

2. Estudio de la actividad antimalárica de las 4(1H)-piridonas, para ello se llevarían a cabo los siguientes ensayos:

2.1. Ensayos de evaluación de la actividad *in vitro* de las 4(1H)-piridonas, en cepas sensibles y resistentes a antimaláricos comerciales. Estudiándose el mecanismo de acción de los compuestos, la selectividad a su diana y su posible toxicidad.

2.2. Ensayo de especificidad de forma, para discernir sobre qué forma del ciclo eritrocítico asexual del parásito son más activos los compuestos a estudio.

2.3. Ensayos de velocidad de acción, para definir el tiempo que necesitan los compuestos para actuar y producir su inhibición (en un 50% ó 90%).

2.4. Ensayos sobre formas sexuales o gametocitos, para estudiar su posible actividad bloqueando la transmisión del parásito.

2.5. Ensayos en combinación con los principales antimaláricos comerciales disponibles para definir efectos aditivos, sinérgicos, antagónicos o indiferentes, de los compuestos seleccionados.

2.6. Ensayos de recrudescencia para discernir la capacidad de generar parásitos resistentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Condiciones generales de cultivo

3.1.1. Medio completo de cultivo

RPMI 1640 suplementado con HEPES 25 mM, bicarbonato de sodio y glutamina (GIBCO™ referencia: 52400-025), completado con suero humano AB al 10% (Cambrex referencia: 14-490 E) e hipoxantina 0,15 mM (HT50x, GIBCO™ referencia: 41065). El suero humano fue descomplementado durante 30 minutos a 56°C, repartido en alícuotas y almacenado a -20°C hasta su uso. El medio completo fue preparado fresco y previamente precalentado a 37°C, cada vez antes de su uso en los cultivos.

3.1.2. Glóbulos rojos o eritrocitos (*Red Blood Cells, RBCs*)

Los eritrocitos se prepararon a partir de bolsas de concentrado de eritrocitos, procedentes de donaciones incompletas proporcionadas por la Cruz Roja Española, que se dividieron en alícuotas y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Para preparar los eritrocitos, se centrifugó cada alícuota, lavándose con medio RPMI sin completar (5 minutos a 2000 rpm). Tras tres lavados, los eritrocitos se ajustaron al 50% con medio completo y se almacenaron a 4°C hasta su uso, durante un máximo de 7 días. Las muestras biológicas humanas, fueron obtenidas con arreglo a la ética y a los términos acordados en el informe de consentimiento, para su uso en investigación.

3.1.3. Parásitos

Las cepas 3D7, Dd2, FCR3-A, K1, HB3, W2 y NF54 de *P. falciparum* procedían del *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4)*, (Tabla 4) y se mantuvieron en cultivo continuo con medio completo y un valor de hematocrito del 5% (salvo necesidades específicas de cada ensayo) utilizando un método adaptado de Trager y Jensen (Trager y Jensen, 1976). El cultivo estándar (20 mL) se mantuvo en flasks de 75 cm² (Corning-Canted neck referencia 430641) a 37°C en un incubador Heracell 240i CO₂ incubator (Heraeus-ThermoScientific), con una atmósfera baja en oxígeno (5% CO₂, 5% O₂, 95% N₂). A diario se evaluó el estado de los cultivos por extensión en capa fina, fijándose las extensiones con metanol y tiñéndose durante 5 minutos en Giemsa (Merck, referencia: 1,09204) al 5% en agua tamponada a pH 7,2.

Tabla 4. Características, origen y resistencias de las cepas de *P. falciparum* empleadas.

Cepas	Características	Resistencias	Referencia <i>MR4</i>
3D7	Clonado del aislado NF54	-	MRA-102
Dd2	Clonado de W2-Mefloquina	Cloroquina, Mefloquina, Pirimetamina	MRA-156
FCR3-A	Suministrado por <i>Wellcome Laboratories</i>	Cloroquina, Atovaquona	
K1	Derivado aislado paciente Tailandia	Cloroquina, Pirimetamina	MRA-159
HB3	Derivado aislado paciente Honduras	Pirimetamina	MRA-155
W2	Derivado aislado pacientes Lao-Sierra Leona (50:50)	Cloroquina, Pirimetamina	MRA-157
NF54	Derivado aislado paciente aeropuerto Amsterdam	-	MRA-1000

La parasitemia fue calculada mediante microscopía óptica como un porcentaje, contabilizando el número de eritrocitos parasitados, en cada forma asexual específica, entre un número total de al menos 1000 eritrocitos, usando para ello un microscopio Olympus Cx31 con el objetivo 100x-aceite inmersión. La gametocitemia se calculó contabilizando como un porcentaje, el número de gametocitos (determinando cada fase específica) por número total de eritrocitos (5000 *RBCs*). El factor de crecimiento se calculó dividiendo la parasitemia final entre la parasitemia inicial obtenida. Las diferentes fases de desarrollo (anillos jóvenes y viejos, trofozoítos jóvenes y viejos y esquizontes jóvenes y viejos) fueron determinadas y contabilizadas según el criterio descrito por Silamunt (Silamunt et al., 1999) para las formas asexuales y por Carter y Miller para los diferentes estadios de gametocitos (Carter y Miller, 1979).

3.1.4. Protocolo de descongelación de los parásitos

Los viales congelados se retiraron de su lugar de almacenaje (Revco -180°C) y se introdujeron, para su descongelación inmediata, en un baño de agua a 37°C. Una vez descongelados, se transfirió el volumen del vial a un falcon de 50 mL. A continuación se añadió NaCl al 12% (peso/volumen) en PBS (0,2 mL por mL de volumen del vial), muy lentamente, gota a gota y agitando el tubo simultáneamente. Después se añadió lentamente, gota a gota y agitando el tubo, NaCl al 1,6% (peso/volumen) en PBS (10 mL por mL de volumen del vial). Y por último se añadió lentamente, gota a gota y agitando el tubo, NaCl al 0,9% (peso/volumen) y 0,2% (peso/volumen) de glucosa en PBS (10 mL por mL de volumen del vial). La solución resultante se centrifugó durante 5 minutos a 1800 rpm, a temperatura ambiente, descartándose el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 10 mL de RPMI incompleto, añadiéndolo lentamente al principio. A continuación se centrifugó durante 5 minutos a 1800 rpm y se descartó el sobrenadante. Por último se resuspendió el pellet en 10 mL de medio de cultivo completo,

transfiriéndolo a un flask de cultivo de 25 cm² (Corning-*Canted neck*, referencia 430639), añadiendo 100µL de eritrocitos e incubando los cultivos en el incubador a 37°C en una atmósfera baja en oxígeno (5% CO₂, 5% O₂, 95% N₂).

3.1.5. Protocolo de sincronización de los parásitos

Para establecer la sincronía de los cultivos asexuales, se tuvieron en cuenta dos métodos diferentes: tratamiento con sorbitol para la obtención de formas jóvenes o anillos y tratamiento con plasmion, para la obtención de formas maduras: trofozoítos y esquizontes. La solución de sorbitol se preparó al 5% (peso/volumen) de sorbitol (Sigma-Aldrich, referencia 6021) en agua filtrada estéril para cultivos celulares (Sigma-Aldrich, referencia W3500). La solución de Plasmion® se recibió ya preparada para su uso por los laboratorios *Laboratoire Fresenius Kabi* de Francia.

3.1.5.1. Tratamiento con Sorbitol

Método descrito por Lambros y Vanderberg (Lambros y Vanderberg, 1979) basado en la permeabilidad diferencial de la membrana de los eritrocitos parasitados y que selecciona exclusivamente los eritrocitos parasitados con formas jóvenes o anillos. Para llevar a cabo el protocolo, la parasitemia del cultivo de partida se determinó calculando a partir de ésta, el volumen de cultivo necesario para realizar el sorbitol en las condiciones que se necesitasen según cada ensayo. El sorbitol y el medio completo se precalentaron a 37°C antes de comenzar el protocolo. El volumen de cultivo necesario se centrifugó a 1800 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, descartándose el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 5 volúmenes de la solución precalentada de sorbitol, homogeneizándolo bien con la pipeta e incubándose durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo se centrifugó el cultivo 5 minutos a 1800 rpm y se descartó el sobrenadante, lavándose el cultivo dos veces con 20 mL de medio completo con el fin de retirar el sorbitol sobrante. Tras el segundo lavado, se eliminó el sobrenadante y el pellet se ajustó añadiendo el medio completo y los eritrocitos necesarios para mantener el hematocrito en las condiciones específicas del cultivo, 5% ó 2%, en un flask de 75 cm².

3.1.5.2. Tratamiento con Plasmion

Método basado en el comportamiento de sedimentación de los parásitos que permite seleccionar el fenotipo de parásitos *knobs*⁺, que flotan en una solución de

plasmion, mientras que las formas jóvenes o eritrocitos no parasitados sedimentan, seleccionándose por tanto las formas maduras *knobs*⁺: trofozoítos y esquizontes. Para llevar a cabo el protocolo, se determinó la parasitemia del cultivo inicial, precalentándose una alícuota de plasmion y el medio completo a 37°C antes de comenzar el protocolo. El cultivo se transfirió a un tubo de 15 mL, centrifugándose durante 5 minutos a 1800 rpm a temperatura ambiente y retirándose el sobrenadante. Se añadieron 1,4 mL de medio completo y 2,4 mL de solución de plasmion por cada mL de pellet, mezclándose suavemente. El tubo se incubó en un baño a 37°C durante 30 minutos, sin movimiento alguno para evitar interferir en el proceso de sedimentación. Transcurrido ese tiempo, se recogió el sobrenadante con las formas maduras, que se utilizó para llevar a cabo una dilución o para establecer las condiciones de trabajo específicas requeridas en cada ensayo.

3.2. Tratamientos de sincronización específicos

Los tratamientos de sincronización se describen según se apliquen a las formas eritrocíticas asexuales o sexuales del parásito. Los tratamientos específicos para las formas asexuales se realizaron con el objetivo de establecer un cultivo altamente sincrónico, que perdurase en el tiempo y que permitiera de esta manera, realizar los ensayos de especificidad de forma.

3.2.1. Sincronización de formas asexuales

3.2.1.1. Sorbitol 34 horas

Método basado en el protocolo descrito por Lambros y Vanderberg (Lambros y Vanderberg, 1979) con algunas modificaciones. Se aplicaron dos tratamientos secuenciales con sorbitol cada 48 horas y 34 horas después del segundo tratamiento, se realizó un tercer tratamiento de sorbitol para obtener los anillos de nueva formación. Tras el primer tratamiento de sorbitol, el cultivo fue ajustado al 1% de parasitemia y 5% de hematocrito en un flask de 75 cm² con un volumen total de 20 mL. A las 24 horas de cultivo se realizó un cambio de medio. A las 48 horas de cultivo, se realizó el segundo sorbitol y 34 horas después de éste, se realizó el tercer sorbitol. El porcentaje de parasitemia y la fase predominante del cultivo, se evaluaron mediante extensión por tinción Giemsa cada 24 horas. Desde las 72 horas de cultivo, éste fue evaluado cada dos horas hasta un tiempo total de cultivo de 96 horas. A su vez, tras cada tratamiento de sorbitol, se realizó una extensión por tinción Giemsa con el fin de medir el resultado de

cada tratamiento. Este método de sincronización se efectuó tres veces con dos réplicas cada vez.

3.2.1.2. Sorbitol 6 horas

Método basado en el protocolo descrito por Ter Kuile con algunas modificaciones (Ter Kuile et al., 1993). Se aplicaron dos tratamientos secuenciales con sorbitol cada 48 horas. Veinticuatro horas después del segundo tratamiento de sorbitol se llevó a cabo un tratamiento de plasmion. Seis horas después de este tratamiento de plasmion se efectuó un tercer tratamiento de sorbitol. Después del primer tratamiento de sorbitol, el cultivo se ajustó al 1% de parasitemia y 5% de hematocrito en flask de 75 cm², con 20 mL de volumen total de cultivo. Realizándose un cambio de medio a las 24 horas de cultivo, entre los dos tratamientos secuenciales de sorbitol. El porcentaje de parasitemia y la fase predominante se evaluaron mediante una extensión por tinción Giemsa cada 24 horas. Tras 2 y 6 horas después del tratamiento con plasmion, el cultivo también fue evaluado (tiempo total de cultivo: 168 horas). Después de cada tratamiento de sincronización, se realizó una extensión por tinción Giemsa para medir el resultado de cada tratamiento específico. Este método de sincronización se llevó a cabo tres veces con dos réplicas cada vez.

3.2.2. Sincronización de formas sexuales o gametocitos

Este método se utilizó en el protocolo de producción de gametocitos para eliminar las formas asexuales presentes en el cultivo. El protocolo de sorbitol realizado es el mismo que el explicado en el punto 3.1.5.1. salvo por la adición de 2,5 volúmenes de sorbitol por pellet obtenido. Además, en el último paso el cultivo se ajustó a un hematocrito del 2% sin añadir eritrocitos frescos.

3.3. Tratamientos específicos para inducir la gametocitogénesis

Dado que existen muchos factores que pueden potenciar la producción de gametocitos o gametocitogénesis, sin que aún esté definido cual de todos es el más relevante, se compararon los distintos métodos descritos en la bibliografía, denominando cada método con el nombre del autor que lo describía.

3.3.1. Método de *Akompong*

Protocolo descrito por Akompong que comienza preparando a día 0 de cultivo, parásitos asexuales diluidos al 0,2% de parasitemia y 6% de hematocrito en flask de 75 cm² con 20 mL de cultivo. A día 3 de cultivo, el hematocrito de los cultivos se redujó del 6% al 3% con medio de cultivo, manteniéndolo así durante los 18 días siguientes con cambios diarios de medio de cultivo. Desde el día 0 no se añadieron eritrocitos frescos a los cultivos. Se prepararon a diario extensiones por tinción Giemsa de los cultivos, para monitorizar su parasitemia y gametocitemia (Akompong et al., 2000).

3.3.2. Método de *Bennett*

Protocolo descrito por Bennett donde los cultivos de parásitos asexuales, 20 mL en flask de 75 cm², fueron diluidos al 1% de parasitemia y 2% de hematocrito usando eritrocitos con el contenido de hemoglobina reducido. El medio de los cultivos se cambió a diario durante 8 días y la parasitemia y la gametocitemia fue estimada por extensiones de tinción Giemsa. La reducción del contenido en hemoglobina de los eritrocitos, se obtuvo incubando los eritrocitos durante 30 minutos con una solución hipotónica (HEPES 5mM, glucosa 11mM, ATPmM, en agua destilada) (Bennett et al., 2005).

3.3.3. Método de *Chavalitshewinkoon-Petmitr*

Protocolo descrito por Chavalitshewinkoon-Petmitr donde los cultivos fueron tratados con dos tratamientos secuenciales de sorbitol y posteriormente cultivados a una parasitemia del 0,5% ó del 1%, dependiendo de que cepa se utilizase, con un valor de hematocrito del 2%, con 20 mL de medio de cultivo en flasks de 75 cm². El medio de cultivo fue cambiado los días 4 y 6 y a diario desde los días 8 al 15 de cultivo. En los días 9, 10 y 11 se añadieron 2,5 volúmenes de solución de sorbitol al 5% (peso/volumen) por pellet de cultivo obtenido, durante 5 minutos para eliminar las formas asexuales que pudiesen quedar en el cultivo, seleccionándose así sólo los gametocitos. Para monitorizar la parasitemia y gametocitemia se realizaron a diario extensiones por tinción Giemsa (Chavalitshewinkoon-Petmitr et al., 2001).

3.3.4. Método de *Chavalitshewinkoon-Petmitr+Bennett*

Protocolo que combina ambos métodos utilizando las condiciones de cultivo descritas en el método de Chavalitshewinkoon-Petmitr, complementado los cultivos con

los eritrocitos con la reducción de hemoglobina aplicada del protocolo descrito por Bennett (Chavalitsheewinkoon-Petmitr et al., 2001; Bennett et al., 2005).

3.3.5. Método de Schneweis

Protocolo descrito por Schneweis donde cultivos de parásitos asexuales fueron sincronizados y diluidos al 0,5-1% de parasitemia inicial con un valor de hematocrito del 10%, siendo el volumen de cultivo de 20 mL en flask de 75 cm², realizándose un cambio de medio a diario. Transcurridas 48 horas de cultivo, se añadió una suspensión de eritrocitos lisados no infectados (*Lysed uninfected erythrocytes*, *LUE*) a una concentración final del 20% para inducir la gametocitogénesis. Para monitorizar la parasitemia y gametocitemia se realizaron a diario extensiones por tinción Giemsa (Schneweis et al., 1991). La preparación de la suspensión de eritrocitos lisados no infectados (*LUE*) se realizó a partir de eritrocitos lavados con RPMI concentrados al 50% que se congelaron a -20°C durante 20 minutos y posteriormente se calentaron de nuevo a 37°C durante 20 minutos. Repitiéndose este proceso dos veces. Para reducir su posible toxicidad, se realizó una dilución de una parte de eritrocitos sujetos a lisis con una parte de medio RPMI sin completar. Esta suspensión de *LUE* estuvo dispuesta para ser añadida a los cultivos en el protocolo necesario.

3.3.6. Método de Chutmongkonkul

Protocolo descrito por Chutmongkonkul donde parásitos asexuales fueron sincronizados y diluidos a una parasitemia inicial del 0,75% y un hematocrito del 2%, siendo 20 mL el volumen total de cultivo en flasks de 75 cm². A día 4 de producción se realizó un cambio de medio. A día 5, se añadieron 40 µL de pirimetamina (24,87 ng/mL) para eliminar las formas asexuales presentes en el cultivo. A día 7 de producción, el cultivo fue lavado dos veces con 40 mL de RPMI (centrifugándose a 1800 rpm, 5 minutos) con el objetivo de reducir la cantidad de droga. Entre los días 6 y 15 de cultivo, se cambió el medio a diario. Para monitorizar la parasitemia y gametocitemia se realizaron a diario extensiones por tinción Giemsa (Chutmongkonkul et al., 1992).

3.3.7. Método combinado de Chutmongkonkul+Schneweis

Método combinado de los protocolos descritos por Chutmongkonkul y Schneweis, donde los cultivos se prepararon según las condiciones descritas por

Chutmongkonkul complementando los cultivos en el día 4, con la adición de eritrocitos lisados no infectados (*LUE*) al 20%, propio del protocolo descrito por Schneweis (Chutmongkonkul et al., 1992; Schneweis et al., 1991).

3.3.8. Método combinado de Chavalitshewinkoon-Petmitr+Schneweis

Método combinado de los protocolos descritos por Chavalitshewinkoon-Petmitr y Schneweis, donde se utilizaron los parámetros de cultivo del procedimiento descrito por Chavalitshewinkoon-Petmitr complementado con la adición de eritrocitos lisados no infectados (suspensión *LUE* al 20%) en el día 4 de la producción según lo descrito por Schneweis (Chavalitshewinkoon-Petmitr et al., 2001; Schneweis et al., 1991).

3.4. Protocolos de los distintos ensayos realizados para definir el perfil antimalárico de las 4(1H)-piridonas

3.4.1. Inhibición de la actividad de la ubiquinol-citocromo c reductasa (complejo *bc1* ó complejo III)

El protocolo llevado a cabo para la obtención de mitocondrias aisladas de *P. falciparum* y de la línea celular HEK293 fue el descrito por Dong (Dong et al., 2012). Cultivos con eritrocitos parasitados en mayoría de trofozoítos, fueron recogidos por centrifugación y lisados con saponina al 0,05% (peso/volumen) en RPMI. Los parásitos fueron entonces lavados con H-medium (sacarosa 0,07 M, manitol 0,21M, EGTA 1 mM, MgCl₂ 5 mM, H₂PO₄ 5 mM y HEPES 4 mM, a pH 7,4) y resuspendidos con el mismo medio, en presencia de PMSF 1mM e inhibidores de proteasas (Roche, referencia 11873580001). Los parásitos fueron lisados por cavitación con nitrógeno (4639 *Cell disruption Bomb*, Parr, USA) a 1600psi durante 25 minutos a 4°C. Los restos celulares fueron descartados por centrifugación a 1200g durante 10 minutos a 4°C. A continuación el pellet obtenido se centrifugó a 10000g durante 20 minutos a 4°C, obteniéndose la fracción mitocondrial que se resuspendió con el correspondiente buffer: sacarosa 0.8 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 7,4 y 0,1% BSA, antes de su separación por un gradiente de sacarosa 1-2 M, centrifugándose para ello a 80000g durante 2 horas a 4°C. Las mitocondrias obtenidas en el gradiente, fueron recuperadas y lavadas, para eliminar los restos de sacarosa con buffer de lavado, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 7,4. Por último, las mitocondrias fueron resuspendidas con H-medium e inhibidores de proteasas y PMSF 1mM y guardadas hasta su uso a -80°C. En el caso de las mitocondrias humanas, se usó la línea celular HEK293 (*Human embryonic kidney*

cells, ATCC), centrifugándose a 400g durante 10 minutos y lisándolas por cavitación con N₂, realizando el mismo método que con las mitocondrias de *P. falciparum*.

El estudio de la selectividad de la diana *bc1*, midiendo la inhibición de la actividad ubiquinol-citocromo c reductasa fue el descrito por Fry y Pudney (Fry y Pudney, 1992) con alguna modificación. 40µg/mL de mitocondrias de *P. falciparum* o 15µg/mL de mitocondrias de la línea celular HEK293 fueron incubadas durante 10 minutos con las 4(1H)-piridonas seleccionadas, usando como control del ensayo la atovaquona. Previamente se habían preparado dos placas de diluciones de cada compuesto (una para el ensayo con *P. falciparum* y la otra placa para el ensayo con HEK293), realizándose 10 diluciones seriadas 1/2 de cada compuesto, siendo la concentración máxima de 200nM en el caso de las 4(1H)-piridonas para el ensayo de *P. falciparum* ó 1,56µM en el caso de HEK293. La atovaquona se preparó a 500nM ó 1500nM, para el ensayo con *P. falciparum* o HEK293, respectivamente. A continuación se añadió el buffer de reacción: sacarosa 250 mM, KH₂PO₄ 50 mM, EDTA 0,2 mM, NaN₃ 1 mM y KCN 2,5 mM, conteniendo citocromo c (50µM), incubándose las placas durante 5 minutos. La reacción comenzó con la adición de decilubiquinol a 25µM y midiéndose la reducción del citocromo c a 550nm, cada 10 segundos.

3.4.2. Ensayo en célula entera. Determinación de la IC₅₀ e IC₉₀

La evaluación de la actividad antimalárica en célula entera, se realizó siguiendo el método de incorporación de [³H]-hipoxantina descrito por Desjardins (Desjardins et al., 1979) con el objetivo de estudiar el efecto de las 4(1H)-piridonas en la actividad metabólica del parásito. El método se basa en la medición de la incorporación de un precursor de ácidos nucleicos, marcado radiactivamente, como es la hipoxantina tritiada. Para ello, se prepararon diluciones seriadas de los compuestos en medio de cultivo fresco (sólo completado con suero al 10%, sin adición de hipoxantina), siendo las concentraciones máximas (C_{max}) de los compuestos de: 500ng/mL para las 4(1H)-piridonas, salvo el derivado GSK678137A cuya C_{max} fue de 125ng/mL; 100ng/mL en el caso de la cloroquina si se ensayaba en cepas sensibles y 1µg/mL en cepas resistentes a cloroquina; 125ng/mL para la mefloquina y la artemisina; 1000ng/mL para la quinina; 12,8ng/mL para la atovaquona si se ensayaba en cepas sensibles y 20µg/mL en cepas resistentes a atovaquona; 100µg/mL para el proguanil y en el caso de la pirimetamina 100ng/mL si se ensayaba en cepas sensibles y 20µg/mL en cepas resistentes a la pirimetamina. El ensayo se llevo a cabo en placas de 96 pocillos con 50 µL de

compuesto/pocillo, a los que se añadieron 200 μ L de eritrocitos parasitados con *P. falciparum* al 0,5% de parasitemia y 2% de hematocrito, realizándose el ensayo con tres inóculos distintos, con dos réplicas de cada compuesto ensayado por inóculo. Además se incluyeron tres controles diferentes en cada placa: eritrocitos humanos no parasitados (control negativo), eritrocitos humanos parasitados con *P. falciparum* sin droga y eritrocitos humanos parasitados con *P. falciparum* sin droga en presencia de DMSO al 0,2% (control positivo). Los cultivos fueron marcados con [3 H]-hipoxantina 1 μ Ci/mL (0,25 μ Ci/pocillo) incubándose a 37°C en una atmósfera baja en oxígeno (5% CO₂, 5% O₂, 95% N₂) durante 48 horas en total y congelándose las placas a tiempo final de ensayo a -20°C, para favorecer la hemólisis de los eritrocitos. Posteriormente las placas fueron descongeladas a temperatura ambiente y procesadas, filtrándose en la instalación radiactiva, depositándose el contenido de cada pocillo en los filtros de fibra de cristal (Perkin-Elmer referencia 1450-421), usando para ello un colector semi-automático tipo Wallac-TOMTEC (TOMTEC, Perkin Elmer). Los filtros fueron leídos entonces en un contador beta (Microbeta Trilux Wallac, 1450 LSC&Luminiscence counter, Perkin-Elmer), expresándose la lectura en cpm. Para la determinación de IC₅₀ e IC₉₀, todos los valores fueron normalizados según el valor de los controles positivos (eritrocitos infectados no tratados con droga) y negativo (eritrocitos sin infectar), expresados como porcentaje de control. Se ajustaron los datos a una regresión no lineal para una curva dosis-respuesta no sigmoidea, según la fórmula: $Y=100/[1+10^{(\text{Log IC}_{50}-X)}]$ ó $Y=100/[1+10^{(\text{Log IC}_{90}-X)}]$ donde X es el logaritmo de la concentración e Y es la respuesta, utilizando el software GraphPad- Prism 6.0.

3.4.3. Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad empleado fue el descrito por Almela (Almela et al., 2009), siendo el resultado de citotoxicidad expresado como el valor de Tox₅₀, concentración de compuesto necesaria para producir una disminución en la reducción de resazurina equivalente a un 50% con relación al control sin tratar. Las líneas celulares empleadas fueron: HepG2, *Human hepatocellular carcinoma* y H9C2, *cardiac myoblast cell line*, (ATCC). Se prepararon las placas de ensayo sembrando 10000 células/pocillo de la correspondiente línea celular (HepG2; H9C2), en placas de 96 pocillos, negras de fondo claro, tratadas con colágeno. Las distintas concentraciones de compuestos a ensayar fueron preparadas haciendo 10 diluciones seriadas 1/2 en DMSO. Para reducir el daño del DMSO en las células, el porcentaje de DMSO empleado para disolver los

compuestos (100%) fue reducido al 0,5% con medio de cultivo celular (EMEM suplementado con suero fetal bovino al 5% y L-glutamina 2mM). Así, se añadieron a cada pocillo de la placa de ensayo, 150 μ L de la dilución correspondiente de cada compuesto, incubándose las placas durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de las placas y se añadió resazurina disuelta en PBS al 0,0042% (Merck referencia 158261), incubándose las placas durante 1,5 horas más, tiempo tras el cual se midió por fluorescencia (515 nm excitación- 590 nm emisión) la reducción de resazurina a resorufina, en un fluorímetro multipocillo (Victor², Perkin-Elmer).

3.4.4. Ensayo de actividad sobre formas asexuales eritrocíticas

Se obtuvo un cultivo altamente sincrónico conforme al método descrito por Roncalés (Roncalés et al., 2015. Anexo I). El protocolo optimizado de sorbitol-plasmion-sorbitol fue el empleado para sincronizar el cultivo, manteniéndose altamente sincrónico durante varias semanas. El último tratamiento justo anterior al ensayo de especificidad de forma consistió en realizar un plasmion, cuyo seguimiento cada dos horas permitió definir el “tiempo de inicio del ciclo completo” con un 95% de anillos jóvenes obtenidos. Así, en el “momento de inicio 0 horas” del ensayo de especificidad de forma, un cultivo altamente sincrónico fue ajustado al 5% de hematocrito y 0,5% de parasitemia con el medio completo de cultivo (volumen total, 20 mL), para desarrollar de forma completa durante 48 horas, el ciclo eritrocítico asexual del parásito. En el momento específico de cada forma, entre las 0-7 horas para los anillos jóvenes, 15-22 horas para los anillos viejos, 20-27 horas para los trofozoítos jóvenes, 25-32 horas para los trofozoítos viejos, 30-37 horas para los esquizontes jóvenes y 40-45 horas para los esquizontes viejos, se tomaron muestras del cultivo altamente sincrónico (400 μ L/compuesto) que se ajustaron a un valor de hematocrito del 2% con eritrocitos frescos (1mL de volumen total/pocillo), incubándose en placas de 24 pocillos, durante 5 horas con las 4(1H)-piridonas y antimaláricos comerciales seleccionados: GSK932121A, GW308678X, GSK678137A, GSK375074A, artemisinina, quinina, cloroquina, mefloquina y atovaquona, siendo la concentración ensayada de cada compuesto aquella que causase el 90-95% de inhibición, según el dato de IC₅₀ e IC₉₀ obtenido previamente en la evaluación en célula entera. Después de 5 horas de incubación con los compuestos escogidos, se procesaron las muestras para determinar su efecto inhibitorio utilizando tres métodos complementarios: la medición indirecta de la actividad metabólica por la incorporación de [³H]-hipoxantina, la observación de cambios morfológicos por microscopía óptica y el análisis de los parásitos tratados por citometría de flujo.

3.4.4.1. Método de incorporación de [³H]-hipoxantina

Transcurrido el tiempo de exposición de 5 horas, se transfirió el volumen de cada pocillo a un tubo de 15 mL, retirándose la presión de los compuestos por centrifugación de 5 minutos a 1800rpm y haciendo dos lavados del pellet obtenido con 10 mL de medio RPMI. Tras los lavados, el pellet se resuspendió con 1 mL de medio RPMI completo con suero al 10% pero sin hipoxantina, repartiéndose 200 µL/pocillo, en un total de tres pocillos, de una placa de 96, de forma que todos los compuestos ensayados iban en la misma placa para cada estadio concreto. Se añadieron 50 µL de [³H]-hipoxantina, a una concentración final de 4µCi/mL, incubándose las placas durante 5 horas más, congelándose transcurrido ese tiempo a -20°C. Las placas fueron procesadas en la instalación radiactiva tal y como se explica en el apartado 3.4.2.

El resto del volumen del pellet resuspendido se empleó para la valoración del daño por microscopía óptica, realizándose una extensión por tinción Giemsa y el análisis de los parásitos por citometría de flujo.

3.4.4.2. Análisis por microscopía óptica (MO)

La parasitemia fue determinada según lo explicado en el apartado 3.1.3 pero siendo al menos 5.000 eritrocitos los contados. Los distintos estadios de desarrollo (anillos jóvenes y viejos, trofozoítos jóvenes y viejos y esquizontes jóvenes y viejos, fueron determinados y contabilizados según lo descrito por Silamunt (Silamunt et al., 1999). Para valorar los cambios morfológicos y el daño, se hicieron fotografías de los parásitos sanos y afectados, utilizando para ello un microscopio Leica (Leica DM 4000B) con el objetivo 100x de aceite de inmersión, siendo las fotografías procesadas utilizando el software digital LAS-AF de Leica.

3.4.4.3. Análisis por citometría de flujo (CF)

El método empleado, basado en las diferencias en autofluorescencia y contenido de ADN entre los eritrocitos infectados y no infectados, medidas después del marcaje con YOYO-1, fue el descrito por Jiménez-Díaz (Jiménez-Díaz et al., 2005). Así, se centrifugaron 200 µL del pellet resuspendido (procesado tras las 5 horas de exposición), retirándose el sobrenadante y fijando 10 µL del pellet, en 200 µL de glutaraldehído al 0,025% (volumen/volumen) en Dulbecco's-PBS (DPBS), conteniendo ácido etilenodiaminotetracético al 1mM a pH 7,2. Las muestras se fijaron a 4°C en oscuridad

durante 24 horas. Posteriormente, las células fijadas se lavaron con DPBS a temperatura ambiente, siendo resuspendidos los pellets con 200 μ L de Triton X-100 al 0,25% (volumen/volumen) en DPBS, durante 5 minutos. Tras la centrifugación, el pellet se volvió a resuspender en 0,1 mL de DPBS conteniendo 1 mg/mL de RNasa A, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 0,1 mL de YOYO-1 0,5 μ M en DPBS (preparado a partir de un stock a 10 μ M en DMSO, almacenado a -20°C) que se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Las muestras fueron obtenidas en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, USA) equipado con un láser argón enfriado por aire 15-mW 488-nm.

3.4.5. Ensayo de velocidad de acción

Se prepararon tantos cultivos como compuestos a ensayar hubiese, más un cultivo control sin tratar, ajustándose los cultivos a una parasitemia del 1% con un hematocrito del 2% siendo 20 mL el volumen de cada cultivo. Los cultivos fueron expuestos durante 48 horas a las 4(1H)-piridonas seleccionadas: GSK932121A, GW308678X, GSK678137A, GSK375074A; así como a los antimaláricos comerciales, artemisinina, cloroquina, mefloquina y atovaquona, en concentraciones correspondientes a diez veces el valor de su IC₅₀. A distintos tiempos del ensayo, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 24, 26, 28, 30, 32 y 48 horas, se tomaron muestras de cada flask, para determinar su velocidad de acción utilizando el método de incorporación de [³H]-hipoxantina. Así, 1mL/muestra fue lavado dos veces con 10 mL de medio RPMI, centrifugándose a 1800rpm, 5 minutos en cada lavado y resuspendiéndose los pellets obtenidos tras el segundo lavado en 0,8 mL de medio RPMI suplementado con suero al 10%. Tres alícuotas de 200 μ L se distribuyeron en tres pocillos (3 réplicas) de una placa de 96 pocillos, añadiéndose 50 μ L/pocillo de [³H]-hipoxantina 1,6 μ Ci/mL, las placas fueron incubadas durante 5 horas y tras ese tiempo congeladas a -20°C. Las placas fueron posteriormente procesadas en la instalación radiactiva tal y como se explica en el apartado 3.4.2.

3.4.6. Actividad sobre formas sexuales o gametocitos

Una vez obtenidos los gametocitos con el método optimizado de producción, descrito por Roncalés (Roncalés et al., 2012; Anexo II), los gametocitos jóvenes a día 10 de producción fueron expuestos a la 4(1H)-piridona más avanzada en el proyecto,

GSK932121A, usándose como control positivo del ensayo la dihidroartemisinina (DHA) y como control negativo la doxiciclina. Así, se prepararon 8 diluciones seriadas 1/2 de cada compuesto siendo la concentración máxima ensayada de 10 µg/mL en el caso de la doxiciclina y el compuesto GSK932121A y de 5 ng/mL en el caso de la dihidroartemisinina, transfiriéndose 20 µL de cada dilución a la placa de ensayo que contenía 80 µL/pocillo de gametocitos jóvenes, quedando los cultivos en el ensayo a un hematocrito final del 2%. A las 24 horas, se realizó un cambio de medio, añadiendo medio completo fresco con la concentración correspondiente de cada compuesto pertinente, de forma que la exposición se realizó un tiempo total de 48 horas. A las 48 horas se aspiró el medio de los pocillos, añadiéndose medio completo fresco para realizar la valoración del efecto gametocitocida de las 4(1H)-piridonas, por microscopía óptica (extensión por tinción Giemsa), a las 72 horas de tiempo total de ensayo.

3.4.7. Combinaciones de las 4(1H)-piridonas con otros antimaláricos

Los ensayos que estudiaban la combinación de las 4(1H)-piridonas más avanzadas en el proyecto, es decir de los compuestos GSK932121A y GW308678X, con los antimaláricos comerciales, atovaquona, artemisinina, cloroquina, pirimetamina y proguanil, se realizaron según el método del “tablero de ajedrez”, descrito entre otros por Canfield (Canfield et al., 1995) y Gupta (Gupta et al., 2002). Previamente se habían calculado los valores de IC₅₀ de cada compuesto en célula entera, según lo descrito en el apartado 3.4.2. La Cmax de la placa de combinación sería del valor de 2xIC₅₀ para cada compuesto. Las combinaciones se realizaron en placas de 96 pocillos, de forma que las 4(1H)-piridonas se dispensaban en sentido horizontal, mientras que los antimaláricos a combinar se dispensaban en sentido vertical. En primer lugar se rellenó toda la placa, excepto la columna 1, posiciones A-G, con 50 µL de medio RPMI completado con suero al 10% pero sin adición de hipoxantina. En la columna 1A-G se añadieron 100 µL de la dilución de cada 4(1H)-piridona ensayada, 7 diluciones 10 veces más concentradas, teniendo en cuenta los factores de dilución que llevaba el ensayo (1/2 de cruce de combinación y 1/5 del inóculo de parásitos). En el pocillo H1 sólo se añadieron 50 µL sobre los 50 µL de medio RPMI completado ya añadido. De esta manera la placa quedaba rellenada con 100 µL en todos los pocillos de la columna 1 y 50 µL en el resto de la placa. A continuación se hicieron diluciones seriadas 1/2, con 50 µL desde la columna 1 hasta la columna 10. Así se realizaban las diluciones de las 4(1H)-piridonas que iban en sentido horizontal, siendo su IC₅₀ sola como tal, la fila H de la placa. A

continuación se añadieron 50 μL en cada pocillo de la fila A, de las columnas 1 a la 11 incluidas, del antimalárico a combinar, quedando así éste diluido 1/2. Y siendo la columna 11 la IC_{50} sola del antimalárico que se combinaba, en vertical. Se hicieron diluciones 1/2 hasta la fila G. En la columna 12 se dispensaron los controles negativos (sólo eritrocitos) y positivos (parásitos sin tratar). Una vez preparadas de esta manera las placas, se inocularon con 200 μl de parásitos, al 0,5% de parasitemia y 2% de hematocrito con [^3H]-hipoxantina a 1 $\mu\text{Ci/mL}$ final, incubándose durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo las placas fueron congeladas a -20°C y posteriormente procesadas en la instalación radiactiva tal y como se explica en el apartado 3.4.2.

Los valores numéricos de la clase de interacción existente se expresaron como suma de FICs (SumFIC), siendo FIC la concentración inhibitoria fraccional. Para calcular el FIC se consideró tanto la IC_{50} obtenida para el compuesto que iba sólo en horizontal (fila H, 1-10), como la IC_{50} obtenida para el compuesto que iba sólo en vertical (columna 11, A-G); Así como la IC_{50} de las 4(1H)-piridonas (en horizontal) para cada una de las concentraciones del antimalárico combinado, es decir la IC_{50} para cada fila (A-H), y lo mismo para el antimalárico (en vertical), valorando su IC_{50} para cada concentración de la 4(1H)-piridona en columna (1-11). Así, se seleccionaron todos los pares de datos de combinaciones, ordenándose ascendentemente por el compuesto que fuera en vertical. Se marcaron los pares de valores que correspondían a 0 en ambos compuestos combinados, normalizándose a 1, uno respecto al otro según su propio valor de IC_{50} obtenido, hallándose de esta manera los valores FIC. Posteriormente se calculó la suma de FICs (SumFIC), determinándose el tipo de combinación como sinérgica (SumFIC<0,5); aditiva (SumFIC= 0,5-1); indiferente (SumFIC=1-2) o antagonista (SumFIC>2).

3.4.8. Recrudescencia *in vitro*

El ensayo de recrudescencia fue realizado según el protocolo descrito por Bwijo (Bwijo et al., 1997) con algunas modificaciones. Se prepararon cultivos de la cepa 3D7 a una parasitemia inicial del 1% y a un hematocrito inicial del 2%, en flasks de 25 cm^2 , con 5 mL de volumen de cultivo. Los cultivos fueron tratados con las 4(1H)-piridonas seleccionadas, GW308678X y GSK932121A a concentraciones equivalentes a sus $\text{IC}_{50}\times 100$, $\text{IC}_{50}\times 300$, $\text{IC}_{50}\times 500$ e $\text{IC}_{50}\times 1000$, durante 72 horas (no añadiéndose eritrocitos durante la exposición). De forma paralela se preparó un cultivo control sin tratar, en las mismas condiciones iniciales (1% parasitemia, 2% hematocrito) así como un cultivo

control de eritrocitos no infectados al 2% de hematocrito (Volumen controles 5 mL). De esta manera, se llevaba un control de la viabilidad de los parásitos y de los eritrocitos, respectivamente. Durante el tiempo de exposición de 72 horas, el cultivo control no tratado se diluyó lo necesario para mantener la parasitemia entre un 2-3% para así garantizar la viabilidad del cultivo.

Tras el tiempo de exposición se aspiró el medio de cultivo de cada flask tratado, lavándose el cultivo restante con 10 mL de RPMI, eliminándose así el compuesto tratado. El pellet obtenido se resuspendió con 5 mL de medio completo fresco, manteniéndose en todos los casos el hematocrito al 2% y cultivándose los cultivos en flasks nuevos, evaluándose además la parasitemia de cada cultivo en ese momento. 24 horas después de retirar los compuestos, se realizó un cambio de medio en cada flask previamente tratado, para disminuir la posible concentración residual que pudiese quedar en el cultivo.

A su vez a las 72 horas, el cultivo control se procesó de la misma manera que los cultivos tratados y tras un lavado, el pellet se ajustó a una parasitemia del 1% y se utilizó para preparar 7 diluciones seriadas 1/10, que se usaron para inocular 7 flasks controles (parásitos/cultivo) distintos, con 200 μ L de cada dilución de parásitos, en un volumen total de 5 mL para mantener el hematocrito al 2%. Así la parasitemia en el primer flask control quedaba al 0,1% mientras que en el último flask control quedaba al 0,0000001%. Estos flasks controles (parásitos/cultivo) se emplearían para determinar el tiempo que tardaron en aparecer los parásitos, alcanzando parasitemias entre el 2,5-5%, según la cantidad de parásitos que hubiese en el cultivo (ya fijada por cada dilución empleada), para así relacionarlo con el ensayo de recrudescencia, de forma que se pudiese valorar cuánto parásito se había reducido tras la exposición a los distintos compuestos.

Durante el tiempo total de recrudescencia (28 días) se realizó el cambio de medio completo fresco cada 48 horas, así como la adición de 100 μ L de eritrocitos frescos cada 96 horas (aumentándose el volumen de cultivo lo que fuera necesario para seguir manteniendo el hematocrito al 2%). La parasitemia se estimó cada 48 horas, salvo en el momento que superase el 0,5%, donde ya se estimaba cada 24 horas. El cultivo se descartaba al alcanzar una parasitemia real en el flask del 5% (ya que a la hora de representar los resultados, se consideró la parasitemia corregida alcanzada según el factor de dilución aplicado, considerando para ello la adición de eritrocitos que

se producía durante todo el tiempo del ensayo) o a los 28 días de ensayo. La susceptibilidad de los parásitos que aparecieron durante el ensayo de recrudescencia fue evaluada según el método descrito en el apartado 3.4.2.

Nota: El análisis estadístico de los distintos ensayos llevados a cabo, se realizó comparando la media y desviación estándar obtenida en tres ensayos distintos, analizados con el software GraphPad-Prism 6.0.

RESULTADOS

4.1. Obtención *in vitro* de formas eritrocíticas de *P. falciparum*

Las condiciones óptimas del cultivo *in vitro* de las distintas formas del parásito productor de la forma más letal de malaria, *P. falciparum*, fueron establecidas en el laboratorio. La cepa empleada de rutina fue la 3D7, suplementando el medio de cultivo con suero y eritrocitos humanos para asemejar las condiciones de laboratorio lo más posible a la situación real (pacientes infectados). Diversas cepas con distintos perfiles en cuanto a resistencia o sensibilidad a antimaláricos clásicos se refiere, fueron empleadas según las necesidades de cada ensayo (Tabla 4 del apartado de materiales y métodos). La optimización de los métodos de cultivo y el establecimiento de los protocolos de producción de formas asexuales y sexuales de *P. falciparum* era un objetivo primordial en el laboratorio, para así poder evaluar los compuestos pertenecientes a distintos programas químicos. En concreto en este trabajo se describe la evaluación de derivados de 4(1H)-piridonas, en los distintos estadios eritrocíticos de *P. falciparum*.

4.1.1. Método optimizado de obtención *in vitro* de formas eritrocíticas asexuales altamente sincrónicas de *P. falciparum*

En el hombre, *P. falciparum* tiene un ciclo de vida sincrónico (un solo estadio predominante) de aproximadamente 48 horas de duración. Si bien, esta característica se pierde en condiciones de cultivo, dificultando la obtención de estadios específicos durante el crecimiento del parásito. Por este motivo se compararon los distintos métodos de sincronización disponibles (sorbitol y plasmion) para el cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, estableciéndose finalmente un método optimizado de sincronización (Anexo I).

4.1.1.1. Sorbitol 34 horas

Este método se caracteriza por realizar dos tratamientos de sorbitol secuenciales cada 48 horas y un tercero 34 horas después (Figura 10A). Las propiedades del método se basan en la permeabilidad diferencial de la membrana de los eritrocitos infectados, según sean formas jóvenes o maduras del parásito. Las protusiones o alteraciones que provocan los trofozoítos en la membrana del eritrocito infectado hacen que éste sea más susceptible al sorbitol, de forma que cuando se realiza un tratamiento de sorbitol, los eritrocitos infectados con formas maduras se rompen (por choque osmótico), seleccionando exclusivamente los eritrocitos infectados con formas jóvenes o anillos.

Así, debido al tratamiento de sorbitol inicial, ajustando el cultivo al 1% de parasitemia y 5% de hematocrito tras el sorbitol, el cultivo se enriqueció en anillos en un 80%. Transcurridas 24 horas, el porcentaje de parasitemia fue prácticamente el mismo siendo del 1,15% y predominando los trofozoítos debido a la maduración del cultivo. Tras completar el primer ciclo de vida de 48 horas, el cultivo mostró un factor de crecimiento de 5,87 veces, alcanzándose un porcentaje de parasitemia del 6,75%, con un 97% de nuevos anillos. En este momento, a las 48 horas de cultivo, se realizó un segundo sorbitol.

Una alta parasitemia con un alto porcentaje de anillos es necesaria, en las condiciones iniciales de cada tratamiento de sincronización, para preservar la supervivencia y desarrollo del cultivo. A las 72 horas de cultivo, la alternancia de formas fue la esperada siendo la forma predominante los trofozoítos y obteniéndose el pico de esquizontes a las 78-80 horas de ensayo (Figura 10B). A su vez, a medida que el número de esquizontes disminuía, se produjo un aumento en la formación de nuevos anillos jóvenes (debido a la reinvasión de eritrocitos no infectados por los merozoítos liberados de la rotura o lisis del esquizonte maduro). Se realizó un tercer sorbitol 34 horas después del segundo, con el objetivo de aumentar la sincronía del cultivo. En este momento del cultivo (82 horas, tiempo total), la proporción de anillos observada fue del 40%, no siendo lo suficientemente alta como para mantener una alta parasitemia después del tercer tratamiento de sorbitol, produciéndose una reducción en la parasitemia del 93% tras el tercer sorbitol. Por lo tanto, se dedujo que tres tratamientos de sorbitol en menos de dos ciclos completos del parásito pueden afectar a la viabilidad ya que se observaron gametocitos, como señal de estrés del cultivo, a las 96 horas de tiempo de ensayo.

4.1.1.2. Sorbitol 6 horas

Este método de sincronización está basado en la purificación de formas maduras (trofozoítos y esquizontes) por un gradiente de densidad, usando para ello la solución de plasmion y combinando además tres tratamientos secuenciales de sorbitol, de la siguiente manera: dos tratamientos secuenciales cada 48 horas y un tercero 6 horas después del tratamiento de plasmion (Figura 11A). El cultivo se ajustó al 1% de parasitemia y 5% de hematocrito tras el sorbitol inicial, quedando enriquecido en un 100% en anillos. 24 horas después, se obtuvo un porcentaje de parasitemia del 1,34% predominando los trofozoítos, debido a la maduración del cultivo.

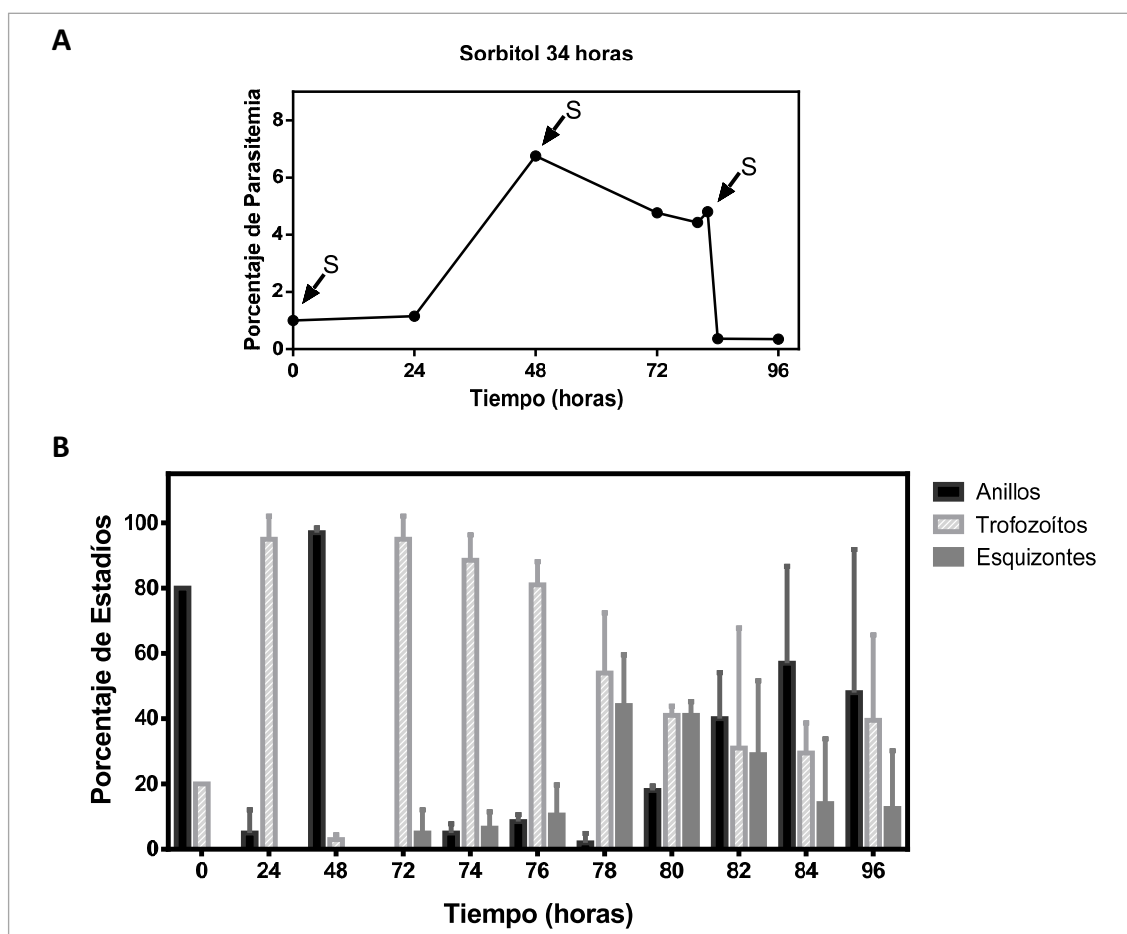


Figura 10. Evolución del cultivo sincrónico durante el ensayo Sorbitol 34 horas (A: Porcentaje de parasitemia (S: sorbitol); B: Porcentaje de cada estadio específico obtenido). Se representa la media y desviación estándar de n=3 ensayos.

Completado el primer ciclo de vida de 48 horas, el cultivo mostró un factor de crecimiento de 4,83 veces, alcanzándose un porcentaje de parasitemia del 6,47%, con un 99% de nuevos anillos. En este momento (48 horas) se realizó un segundo sorbitol, donde tanto la alta parasitemia alcanzada como el alto porcentaje de anillos, resultaron ser esenciales para la supervivencia del cultivo.

A las 72 horas de cultivo, la forma predominante observada en un 89% fueron los trofozoítos, manteniéndose además una alta parasitemia, siendo ésta del 6,89%. Fue entonces cuando se realizó el gradiente de densidad con plasmion, aprovechando el comportamiento de sedimentación de los eritrocitos infectados en la solución de plasmion. Los eritrocitos no infectados e infectados con formas jóvenes o anillos sedimentan en el pellet, quedando en la parte de arriba del gradiente los eritrocitos infectados con formas maduras (trofozoítos o esquizontes). Tras el plasmion, el cultivo

se ajustó a una parasitemia del 1,3-1,5%. Transcurridas 6 horas, se realizó un tercer sorbitol. La proporción de anillos presentes en el momento de realizar el tercer tratamiento de sorbitol, era del 24%, siendo por tanto muy baja y aunque el cultivo se enriqueció en anillos en un 83%, la parasitemia se vio muy afectada, resultando una parasitemia del 0,11% tras el sorbitol. Se confirmó por tanto de nuevo la importancia de una elevada proporción de anillos en la eficiencia del tratamiento con sorbitol. La alternancia de formas, fue la esperada hasta las 168 horas de tiempo de ensayo, donde se obtuvieron anillos en lugar de trofozoítos no observándose gametocitos durante el tiempo total de cultivo (Figura 11B).

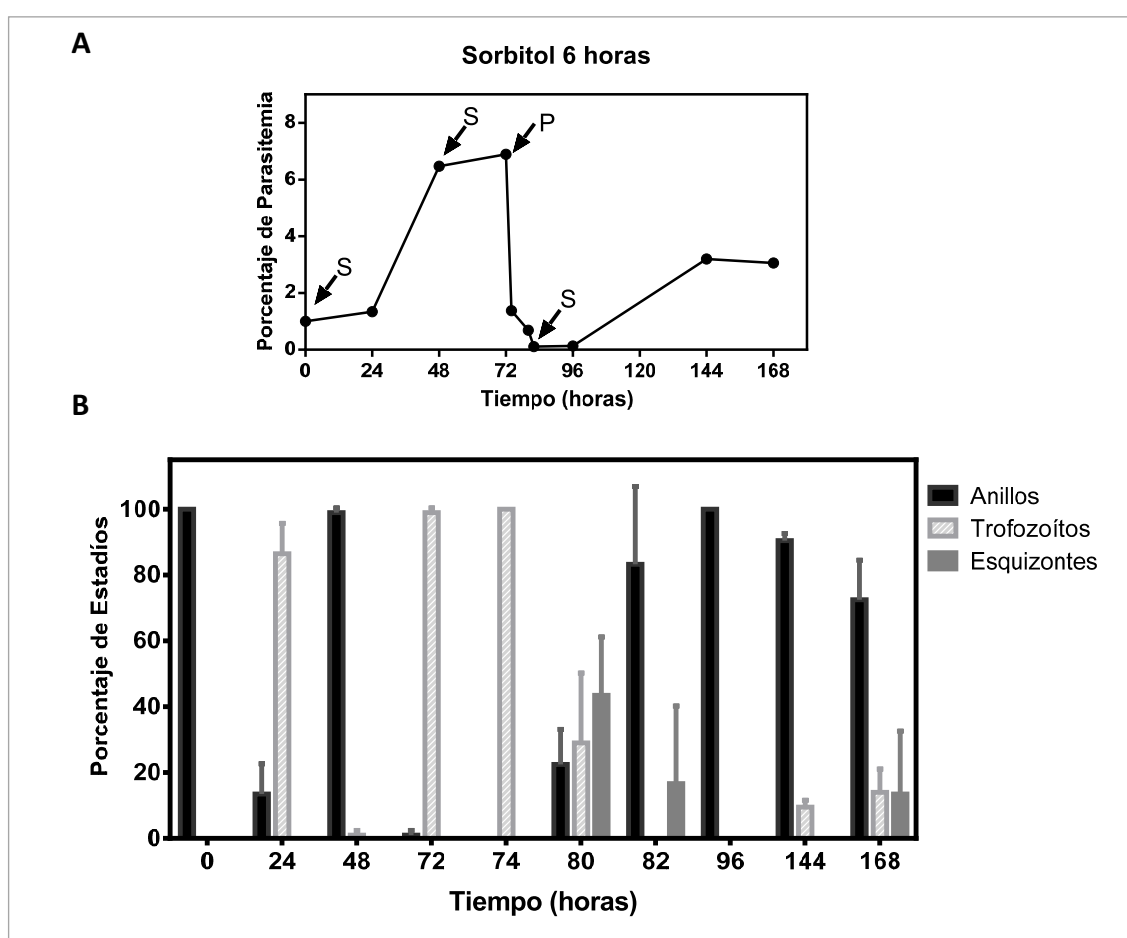


Figura 11. Evolución del cultivo sincrónico durante el ensayo Sorbitol 6 horas. (A: Porcentaje de parasitemia (S: sorbitol, P: plasmion); B: Porcentaje de cada estadio específico obtenido). Se representa la media y desviación estándar de n=3 ensayos.

Si comparamos ambos métodos de sincronización y teniendo en cuenta sus propias características (Figura 12), se puede concluir que el sorbitol fue más agresivo que el plasmion ya que se observaron gametocitos en los tratamientos secuenciales de

sorbitol y no así con el método del plasmion. Siendo además un factor limitante importante, la proporción de anillos existente al comenzar el tratamiento de sincronización de sorbitol, ya que una mayor proporción de anillos (sobre todo anillos jóvenes de menos de 12 horas) garantiza una mayor eficiencia del método de sincronización. Así, se observó una reducción en la parasitemia del 29%, cuando la proporción de anillos era del 99%, ya que la parasitemia observada antes del sorbitol fue del 6,75% frente a un 4,77% de parasitemia obtenida después del sorbitol. Mientras que la reducción de la parasitemia se incrementó al 93%, cuando la proporción de anillos era menor, de un 40%, pasando de una parasitemia del 4,80% antes del sorbitol, al 0,36% después del tratamiento con sorbitol.

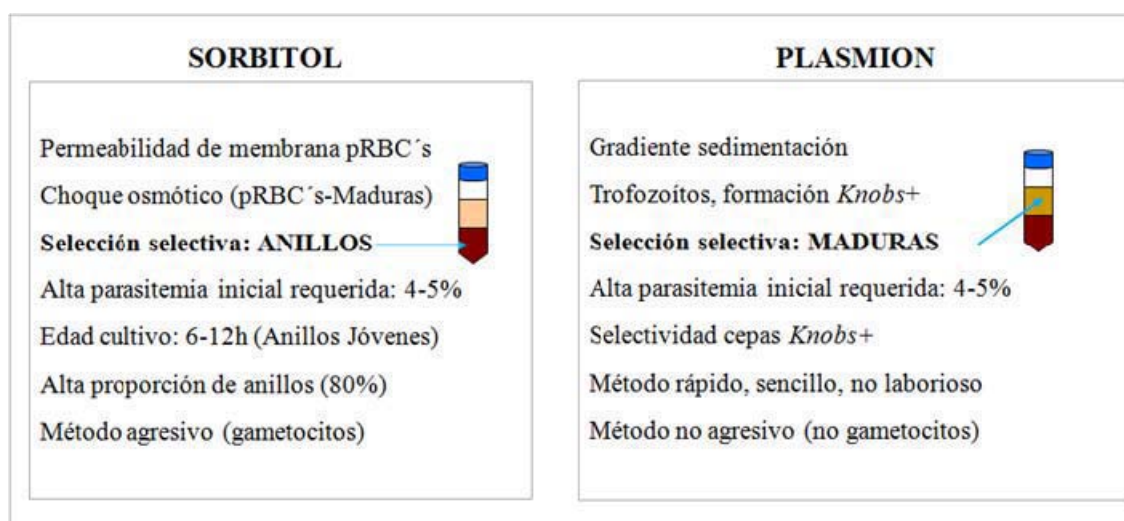


Figura 12. Comparativa de los métodos de sincronización empleados (sorbitol y plasmion; pRBCs: eritrocitos infectados con parásitos (*parasitized red blood cells*)).

Por su parte, un factor importante a considerar en la evolución del cultivo es la capacidad de reinvasión de los parásitos, que se puede ver comprometida si la parasitemia es elevada. Por este motivo se realizaron dos ensayos diferentes con el objetivo de establecer las mejores condiciones de reinvasión según predominen a tiempo inicial de ensayo los anillos o los trofozoítos.

En primer lugar se prepararon cultivos con un alto porcentaje de anillos a tiempo inicial (99%), que se ajustaron a una parasitemia del 1% ó del 0,5% y un hematocrito del 5% en condiciones asincrónicas, para ser comparados con cultivos ajustados a las mismas condiciones de parasitemia y hematocrito inicial, pero con un tratamiento previo de sorbitol para ser así cultivos sincrónicos (Figura 13A).

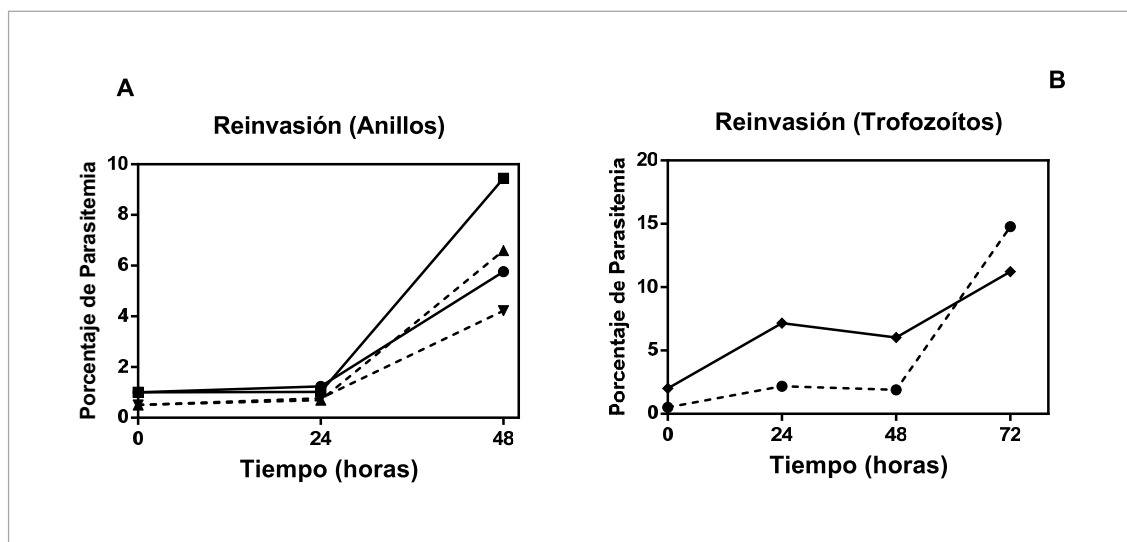


Figura 13. Condiciones de reinvasión para distintos estadios del parásito (A: anillos; B: trofozoítos). (A) Las condiciones ensayadas en los anillos fueron: ■ cultivo sincrónico por sorbitol ajustado al 1% de parasitemia inicial y 5% de hematocrito; ● cultivo asincrónico al 1% parasitemia, 5% hematocrito; ▲ cultivo sincrónico por sorbitol ajustado al 0,5% de parasitemia inicial, 5% hematocrito; ▼ cultivo asincrónico al 0,5% parasitemia, 5% hematocrito. (B) Las condiciones de parasitemia inicial ensayadas en cultivos enriquecidos en trofozoítos en al menos un 80% fueron: ◆ 2% parasitemia, 5% hematocrito; ● 0,5% parasitemia, 5% hematocrito. (Se representa la media y desviación estándar de n=3 ensayos, donde el valor de la desviación estándar fue menor del 5%).

Los parásitos fueron cultivados durante 48 horas, alcanzándose valores finales de parasitemia más altos para los cultivos sincrónicos por tratamiento previo con sorbitol. Los porcentajes de parasitemia final obtenidos fueron del 9,45% y 6,59%, para los cultivos iniciados al 1% y 0,5% respectivamente.

En segundo lugar, se evaluó si los parásitos maduros podían comprometer la capacidad de reinvasión y supervivencia de los cultivos. Para ello se prepararon cultivos enriquecidos en formas maduras, con al menos un 80% de trofozoítos, que se cultivaron durante 72 horas para comprobar si diferentes valores de parasitemia inicial (2% ó 0,5%) podían influir en la parasitemia final obtenida tras un ciclo y medio de vida del parásito (Figura 13B). A tiempo final de ensayo (72 horas), la mayor parasitemia obtenida fue del 14,78%, alcanzándose con los cultivos iniciados al 0,5% de parasitemia. Durante la primera reinvasión de las formas maduras (0-24 horas), los factores de crecimiento obtenidos son similares siendo de 3,7 veces para los cultivos

iniciados al 2% de parasitemia y 4,34 veces para los cultivos iniciados al 0,5%. Si bien, durante la segunda reinvasión (48-72 horas), se obtienen mayores diferencias, siendo 1,86 el factor de crecimiento, del cultivo iniciado al 2% de parasitemia, frente a un factor de crecimiento del 7,8 para los cultivos iniciados al 0,5% de parasitemia. De esta manera se comprobó que la capacidad de reinvasión de las formas maduras se ve afectada a medida que la parasitemia y los números de ciclos de reinvasión del parásito, aumentan con el tiempo de cultivo.

4.1.1.3. Método optimizado de sincronización

Considerando todos estos resultados obtenidos así como los factores limitantes (porcentaje de forma predominante antes del tratamiento de sincronización, parasitemia inicial, factor de crecimiento, etc.), se estableció un método optimizado de sincronización que permite mantener cultivos de *P. falciparum* altamente sincrónicos durante semanas e incluso meses (Tabla 5).

Tabla 5. Método establecido para sincronizar *in vitro* parásitos de *P. falciparum* (3D7). (%p.: porcentaje de parasitemia).

TIEMPO (horas)	CULTIVO	TRATAMIENTO	OBSERVACIONES
0	Asincrónico 5%-7% p. 90% anillos 5% hematocrito	Sorbitol	Al menos 1,5% p. tras tratamiento Considerar disminución parasitemia (80%)
24	Formas maduras	Plasmion	Considerar capacidad reinvasión formas maduras (De x4 a x9 a medida que la sincronía aumenta)
48	Anillos	Sorbitol	Considerar edad anillos (Mejores resultados: anillos de 0-12 horas)
72	Formas maduras	Si %p. >2: Plasmion Si %p. <2: Dilución para ajustar al 1%p	% p. altos en formas maduras, comprometen su viabilidad
96	Anillos	Si %p. >3: Dilución para ajustar al 3%p.	Al día siguiente habrá el mismo %p. pero en maduras
120	Formas maduras	Cambio de medio/Plasmion	Dependiendo del grado de sincronía: Si %formas maduras <90%: Plasmion Si grado sincronía es alto: Cambio de medio
144	Anillos	Sorbitol/Dilución	Sorbitol si persisten formas maduras Dilución para conservar cultivo hasta ensayo especificidad de forma

El método optimizado combina dos tratamientos secuenciales de sorbitol en 48 horas, con un tratamiento de sincronización por plasmion a las 24 horas de cultivo. El grado de sincronía del cultivo se mantuvo durante las 72 horas que se evaluó el cultivo, incrementándose la parasitemia entre 4-9 veces tras el tratamiento de plasmion. El ratio de crecimiento va aumentando a medida que el cultivo aumenta su sincronía con el tiempo. A su vez el cultivo mostró una buena capacidad de reinvasión de las formas

maduras, sin que la viabilidad de los parásitos se viera afectada, ya que no se observaron gametocitos (Figura 14).

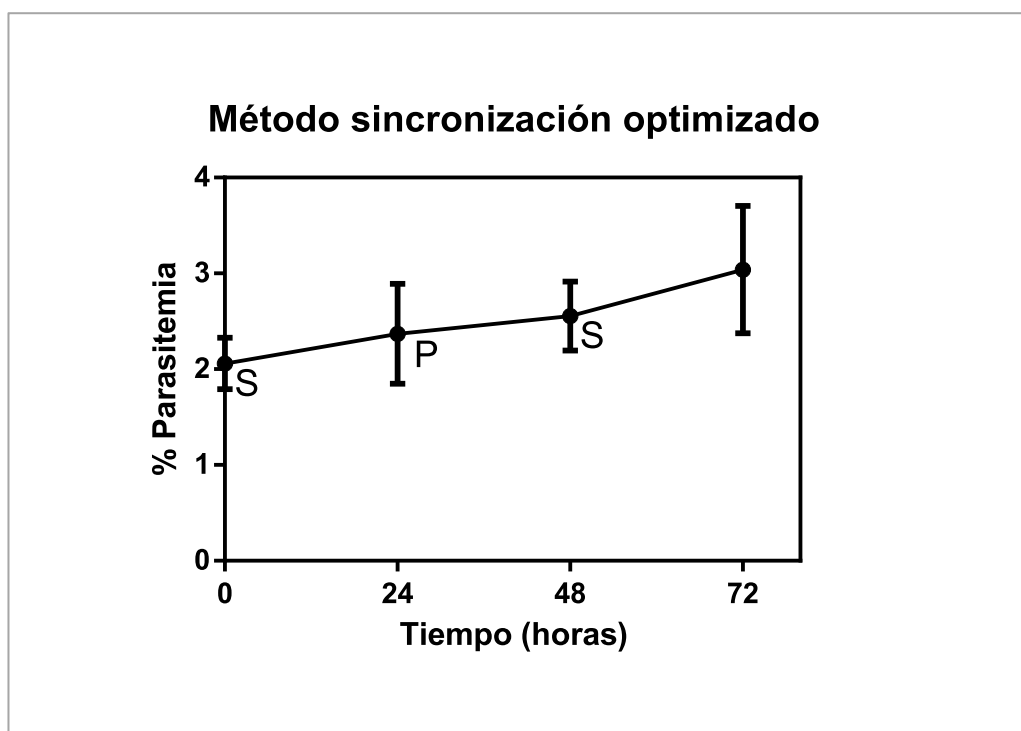


Figura 14. Método de sincronización optimizado. Representación del porcentaje de parasitemia de parásitos de *P. falciparum* (condiciones iniciales cultivo: 2% parasitemia, 5% hematocrito) sincronizados con tratamientos de 2 sorbitoles (S) secuenciales (a las 0 y 48 horas de cultivo) y un plasmion (P) a las 24 horas de cultivo. (La parasitemia está representada como el valor medio y la desviación estándar obtenido para tres ensayos distintos).

Este procedimiento de sorbitol-plasmion-sorbitol, se puede realizar todas las semanas a lo largo de los meses, considerando las observaciones descritas en la Tabla 5, asegurando la supervivencia y el alto grado de sincronía de los parásitos. Es un método sencillo que además de mantener los parásitos sincrónicos en el tiempo, permitió a su vez, determinar el tiempo en el que se obtenían cada estadio específico de las formas asexuales eritrocíticas del ciclo de vida de *P. falciparum*. Para ello y tras llevar un tiempo manteniendo un cultivo altamente sincrónico, es recomendable realizar un plasmion, como último tratamiento de sincronización previo a la obtención de cada estadio específico del ciclo completo de 48 horas. En la Figura 15 se muestran los cambios en los estadios a lo largo del tiempo, tras un último tratamiento con plasmion.

Las formas jóvenes o anillos se obtuvieron en un 57% transcurridas 6 horas después del tratamiento con plasmion, obteniéndose un máximo porcentaje de anillos del 95%, a las 10 horas después del plasmion.

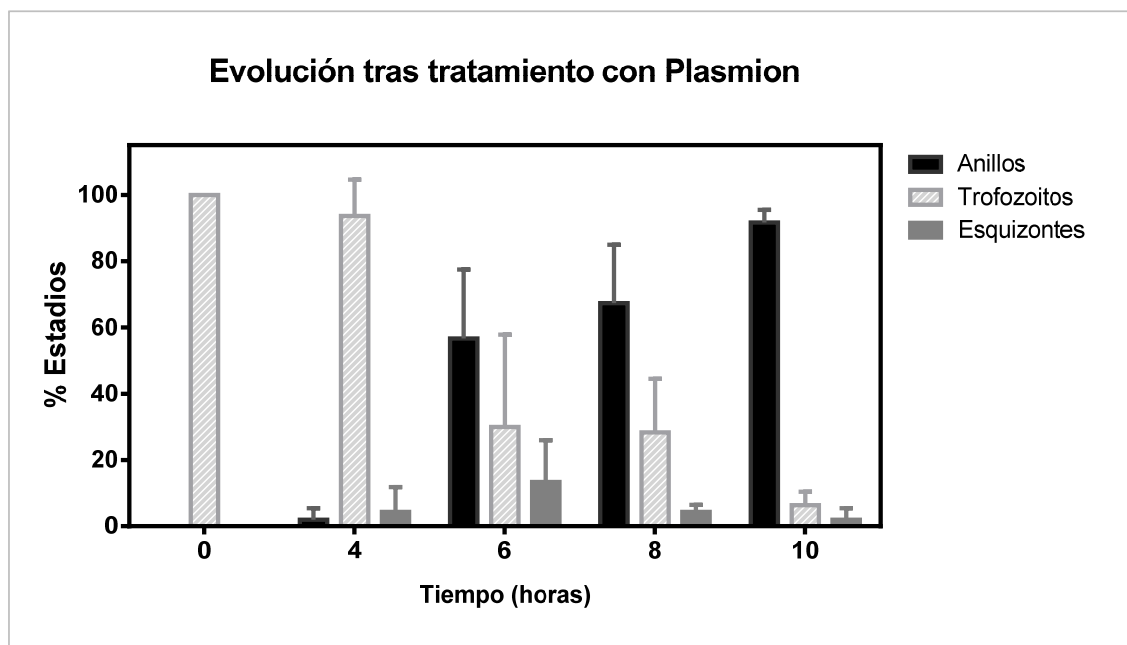


Figura 15. Cambios en los estadios de un cultivo a lo largo del tiempo, tras un tratamiento de sincronización por el método de plasmion. Los parásitos fueron ajustados al 0,5% de parasitemia y 5% de hematocrito tras el tratamiento de plasmion (se representa el valor medio y la desviación estándar obtenido en tres ensayos distintos).

Es ese momento, en el que se observa un 95% de anillos, el que se establece como “tiempo de inicio del ciclo completo” para la obtención de los distintos estadios eritrocíticos asexuales específicos de *P. falciparum*. Conviene considerar el grado de madurez de las formas maduras antes del tratamiento con plasmion, especialmente trofozoitos viejos y esquizontes jóvenes, ya que pueden influir en el “tiempo de inicio del ciclo completo” del cultivo, adelantándose dicho tiempo si se trata de formas muy maduras. Así, el cultivo a “tiempo de inicio del ciclo completo” se ajustó al 0,5% de parasitemia y 5% de hematocrito, siguiéndose su evolución durante las 48 horas del ciclo y obteniéndose los distintos estadios eritrocíticos asexuales específicos: anillos jóvenes (0-7 horas), anillos viejos (15-22 horas), trofozoitos jóvenes (20-27 horas), trofozoitos viejos (25-32 horas), esquizontes jóvenes (30-37 horas) y esquizontes viejos (40-45 horas) (Figura 16B). El cultivo altamente sincrónico mantuvo su viabilidad y

sincronía durante las 48 horas del ciclo, alcanzando una parasitemia final del 7,64% y produciendo un 100% de nuevo anillos jóvenes tras completar el ciclo (Figura 16A).

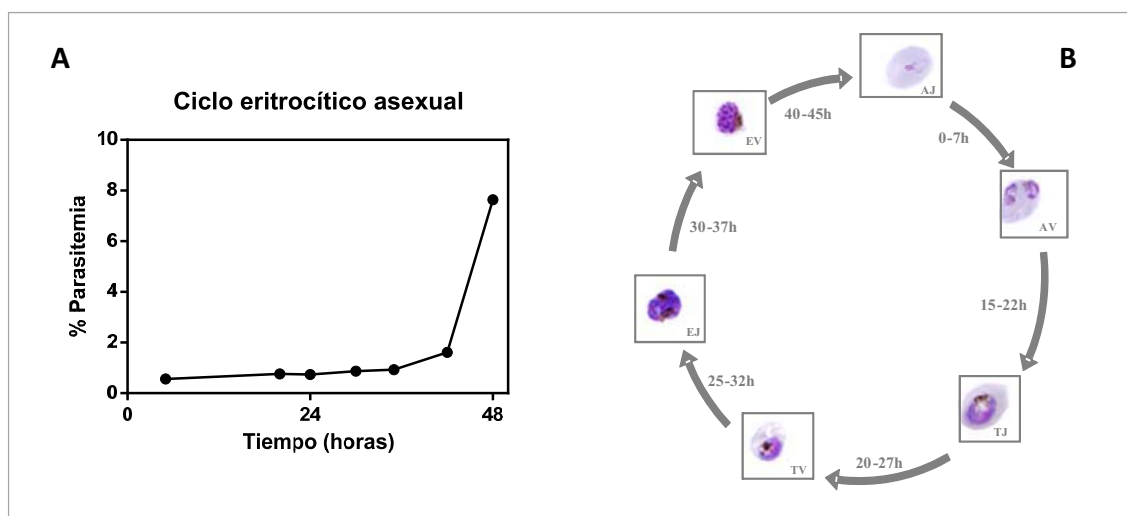


Figura 16. Ciclo eritrocítico asexual completo de parásitos *P. falciparum* altamente sincrónicos. (A: Evolución de la parasitemia, representándose como el valor medio de n=3 ensayos, donde la desviación estándar fue menor del 5%, durante el ciclo completo de 48 horas de un cultivo ajustado inicialmente al 0,5% parasitemia y 5% hematocrito; B: Edad de los distintos estadios eritrocíticos asexuales específicos obtenidos; AJ: anillo joven; AV: anillo viejo; TJ: trofozoíto joven; TV: trofozoíto viejo; EJ: esquizonte joven; EV: esquizonte viejo).

Una vez establecido el ciclo completo de las formas eritrocíticas asexuales, con sus tiempos definidos para la obtención de cada estadio específico, este protocolo se empleó en el estudio de los ensayos de especificidad de forma para determinar en qué estadio eritrocítico asexual actúan específicamente las 4(1H)-piridonas (ver apartado 4.2.4. de la sección de resultados).

4.1.2. Método optimizado de obtención *in vitro* de formas sexuales (gametocitos) de *P. falciparum*

Los parásitos productores de malaria son capaces de modular la proporción de estadios eritrocíticos asexuales que van a desarrollarse en estadios sexuales no replicativos implicados en la transmisión, dichos estadios son los gametocitos. Si bien, la gametocitogénesis o generación de formas sexuales, es un proceso complejo, no del todo conocido. Se sabe que distintas condiciones desfavorables para las formas asexuales potencian la gametocitogénesis. Por este motivo, se estudiaron los distintos factores que influyen en la gametocitogénesis así como los distintos métodos de

producción *in vitro* de gametocitos ya que en condiciones habituales de cultivo no se producen estos estadíos (Anexo II).

Los factores del cultivo considerados para favorecer la gametocitogénesis fueron fundamentalmente: la parasitemia inicial, el grado de sincronía, el porcentaje de hematocrito del cultivo; edad y calidad de la sangre empleada en el cultivo, adición de eritrocitos lisados (*LUE*) al cultivo o la eliminación de formas asexuales del cultivo por distintos procedimientos, como tratamiento con sorbitol o adición de pirimetamina. Ya que se considera que un aumento en la producción de gametocitos se da como respuesta a un crecimiento retardado de las formas asexuales, que se encuentran en condiciones estresantes y desfavorables para su desarrollo. En la Tabla 6, se muestran recopilados los distintos métodos considerados, las características de los mismos y los resultados obtenidos.

En el experimento 1, se compararon tres protocolos que consideraban principalmente los siguientes factores: reducción de hematocrito, del 6% al 3%; reducción del contenido de hemoglobina por tratamiento con solución hipotónica durante 30 minutos; y la eliminación de las formas asexuales del cultivo por pulsos de sorbitol. Además dado que no todas las cepas producen gametocitos en la misma medida, aún siendo estimulada la producción de la misma manera, se comparó la producción de gametocitos entre las cepas 3D7 y Dd2, sincronizándolas previamente al protocolo de producción. La mayor producción de gametocitos en este experimento, se obtuvo con la cepa 3D7 y con el tratamiento de eliminación de formas asexuales como principal factor inductor de la gametocitogénesis. Ni la reducción de hematocrito ni la reducción en el contenido de hemoglobina, potenciaron la producción de gametocitos.

En el experimento 2, se evaluó si la producción de gametocitos aumentaba cuando se combinaba en el protocolo la reducción de formas asexuales con la reducción del contenido de hemoglobina, considerando además diferentes parasitemias iniciales: 0,5% ó 1%. El número de gametocitos obtenidos fue mayor con la combinación de ambos factores, siendo además la cepa Dd2 mayor productora que la cepa 3D7 en estas condiciones. Sin embargo, este método fue descartado por no reducirse del todo el número de formas asexuales (*Tabla 6). Respecto al porcentaje de parasitemia inicial se estableció como óptimo empezar al 0,5% de parasitemia, ya que parasitemias más bajas, al inicio del cultivo de producción, favorecerían la formación de gametocitos.

En el experimento 3, se comparó la capacidad de producción de distintas cepas, reduciendo además las formas asexuales presentes en el cultivo por pulsos de sorbitol. La mayor producción de gametocitos, con una reducción total de formas asexuales, se obtuvo con la cepa NF54.

En el experimento 4, se estudió si el empleo de cepas recién descongeladas, evitando así el número de pases en el laboratorio, contribuía a la producción de gametocitos. Se vio que efectivamente era así, además el grado de sincronía de las cepas recién descongeladas es alto, por lo que se agrupaban dos factores inductores: grado de sincronía y pocos pases del cultivo.

En el experimento 5 se evaluó si la adición de eritrocitos lisados (*LUE*) en combinación con la eliminación de formas asexuales, por pulsos de sorbitol, potenciaba el número de gametocitos, comparándolo además con el otro método de eliminación de formas asexuales que consistía en la adición de pirimetamina al cultivo a baja concentración (24,87ng/mL). La mayor gametocitemia observada fue del 1,05% y se obtuvo con el método combinado de adición de *LUE* y eliminación de formas asexuales por pulsos de sorbitol. Descartándose además la adición de pirimetamina al cultivo, ya que podía afectar a los gametocitos jóvenes y no eliminaba del todo las formas asexuales del cultivo.

De esta manera en el experimento 6, se estableció el protocolo optimizado considerando como factores inductores de la gametocitogénesis la combinación de la reducción del número de estadios asexuales, por tratamiento con pulsos de sorbitol y la adición de eritrocitos lisados no infectados (*LUE*).

Además se concluyó que la cepa NF54 recién descongelada era la cepa que mayor producción de gametocitos generaba, cuando se cultivaba con un hematocrito bajo del 2% y manteniendo su grado de sincronía por dos tratamientos secuenciales de sorbitol, previos a empezar el protocolo de producción de gametocitos. Esta cepa fue la elegida para establecer la producción de gametocitos en las condiciones detalladas a continuación (Figura 17).

Tabla 6. Factores estudiados implicados en la gametocitogénesis y su correspondiente producción de gametocitos. El porcentaje de parasitemia en gametocitos (gametocitemia) viene expresado como la media y desviación estándar de tres ensayos distintos (con dos réplicas cada uno). (Sinc.: cultivo sincrónico; *: presencia de formas asexuales y gametocitos en el cultivo; [] Apartado de la sección de material y métodos con la descripción detallada del protocolo empleado).

	Condiciones estudiadas	Protocolo (Basado en)	%Parasitemia Inicial	%Hematocrito	Cepa	% Gametocitemia
Experimento 1	Reducción hematocrito	Akampong [3.3.1]	0,2	6 to 3	3D7-Sinc.	0,08 ± 0,03
					Dd2-Sinc.	0,19 ± 0,02
	Contenido Hemoglobina	Bennett [3.3.2]	1	2	3D7-Sinc.	0,25 ± 0,09*
					Dd2-Sinc.	0,22 ± 0,14*
Experimento 2	Disminución formas asexuales	Chavalitshewinkoon-Petmitr [3.3.3]	1	2	3D7-Sinc.	0,37 ± 0,02
					Dd2-Sinc.	0,25 ± 0,30
	Disminución formas asexuales	Chavalitshewinkoon-Petmitr [3.3.3]	1	2	3D7-Sinc.	0,42 ± 0,05
	Contenido Hemoglobina	Chavalitshewinkoon-Petmitr+Bennett [3.3.4]	0,5	2	Dd2-Sinc.	0,51 ± 0,61
Experimento 3	Disminución formas asexuales	Chavalitshewinkoon-Petmitr [3.3.3]	0,5	2	3D7-Sinc.	0,60 ± 0,26*
					Dd2-Sinc.	1,64 ± 0,24*
	Distintas cepas				3D7-Sinc.	0,34 ± 0,07
					Dd2-Sinc.	0,49 ± 0,07
Experimento 4	Disminución formas asexuales	Chavalitshewinkoon-Petmitr [3.3.3]	0,5	2	FCR3-A-Sinc.	0,00 ± 0,00
					HB3-Sinc.	0,04 ± 0,01
					W2-Sinc.	0,29 ± 0,05
					NF54-Sinc.	0,75 ± 0,20
Experimento 5	Disminución formas asexuales	Chavalitshewinkoon-Petmitr [3.3.3]	1	2	NF54 recién descongelada	0,90 ± 0,09
					W2 recién descongelada	0,67 ± 0,24
	Disminución formas asexuales + LUE	Chavalitshewinkoon-Petmitr [3.3.3]			NF54 recién descongelada	0,62 ± 0,10
	Disminución formas asexuales	Chavalitshewinkoon-Petmitr+Schneweis [3.3.8]	0,75	2	NF54 recién descongelada	1,02 ± 0,05
Experimento 6	Disminución formas asexuales + LUE	Chutmongkonkul [3.3.6]			NF54 recién descongelada	0,44 ± 0,06*
		Chutmongkonkul+Schneweis [3.3.7]			NF54 recién descongelada	0,48 ± 0,19*
	Disminución formas asexuales + LUE	Protocolo nuevo Optimizado	0,75	2	NF54 recién descongelada	1,18 ± 0,07

Así, tras la sincronización, el cultivo se ajustó al 0,75% de parasitemia inicial con un 2% de hematocrito, empezando de esta manera el protocolo de producción (Día 1). El día 4 se añadió la suspensión de *LUE*, a una concentración final del 20% para inducir la gametocitogénesis, cambiándose el medio del cultivo los días 4 y 6 y a diario a partir del día 8 hasta el día 15, siendo 15 días el tiempo mínimo requerido para observar los distintos estadios de gametocitos.

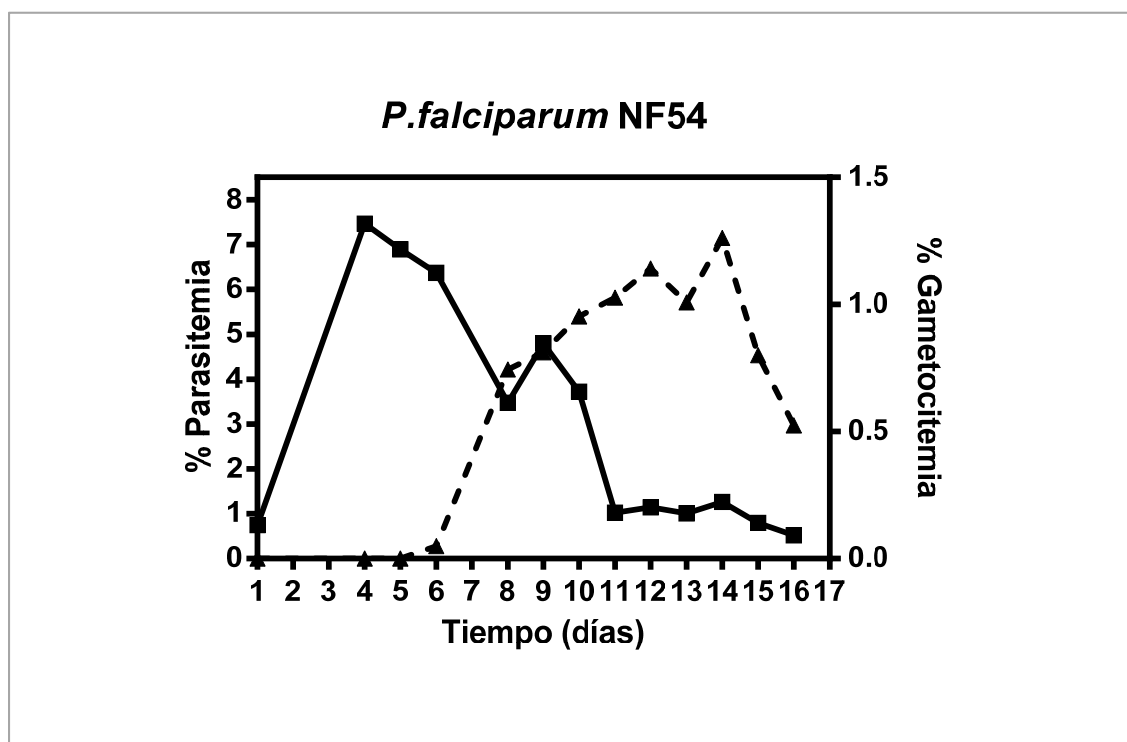


Figura 17. Producción de gametocitos de *P. falciparum* a lo largo del tiempo. (■: porcentaje de parasitemia de formas asexuales; ▲: porcentaje de gametocitemia representándose el porcentaje como el valor medio de n=3 ensayos, donde la desviación estándar fue menor del 5%).

Además para reducir el número de formas asexuales, los días 9, 10 y 11, se realizó un pulso de sorbitol sin que afectase ni a los estadios de gametocitos ni a su maduración, enriqueciéndose de esta manera el cultivo en gametocitos. La gametocitemia o parasitemia en gametocitos obtenida a tiempo final de producción fue del 1,18%, pudiéndose además definir los días en que se obtuvieron cada estadio de gametocitos de la siguiente manera: estadio II-día 6; estadio III-día 11; estadio IV- día 14 y estadio V-día 16, observándose por tanto la maduración de los gametocitos de jóvenes a maduros (Figura 18).



Figura 18. Estadíos de maduración de gametocitos de *P. falciparum*. (Gametocitos jóvenes: estadíos I, II, III; gametocitos maduros: estadíos IV y V).

De esta manera, tanto los estadíos eritrocíticos asexuales altamente sincrónicos, como los estadíos sexuales de *P. falciparum*, podían obtenerse de manera rutinaria en el laboratorio para su posterior uso en los distintos ensayos biológicos, según las necesidades de cada proyecto como por ejemplo, para la caracterización *in vitro* de las 4(1H)-piridonas como potenciales antimaláricos.

4.2. Estudio de la actividad antimalárica de las 4(1H)-piridonas

El programa de química médica basado en las 4(1H)-piridonas, surgió de la necesidad de nuevas entidades químicas que tuviesen distintas propiedades que los antimaláricos clásicos ya conocidos. Dicho programa estaba basado en el clopidol, (Figura 19A) droga anticoccidica descrita como antagonista del ubiquinol, con actividad sobre distintas especies de *Plasmodium*, incluyendo cepas resistentes a cloroquina. Se desarrollaron distintas modificaciones químicas en la estructura química del clopidol, con el fin de mejorar su actividad antimalárica, como por ejemplo, la introducción de una cadena lipofílica en su carbono 5 (C-5), siendo éste el punto de partida del desarrollo de las 4(1H)-piridonas como nueva familia química (Figura 19B).

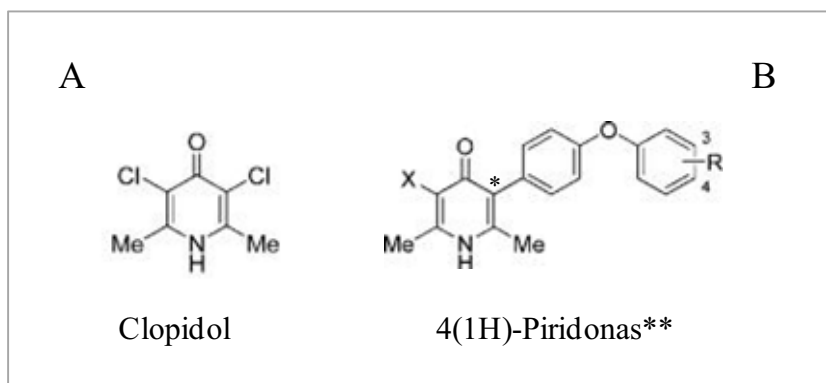


Figura 19. Estructura química del clopidol (A) y de las 4(1H)-piridonas (B). **X: Cl; *C-5: cadena lipofílica fenoxiaril.

4.2.1. Actividad sobre el complejo *bc1* (complejo III)

Dado que el clopidol y la atovaquona están descritos como inhibidores de la cadena electrónica del transporte mitocondrial, el papel de las 4(1H)-piridonas como posibles inhibidores de la cadena electrónica mitocondrial también fue estudiado. Para ello se seleccionaron una serie de derivados químicos de las 4(1H)-piridonas que fueron evaluados en distintos ensayos para determinar su posible potencial antimalárico (Figura 20).

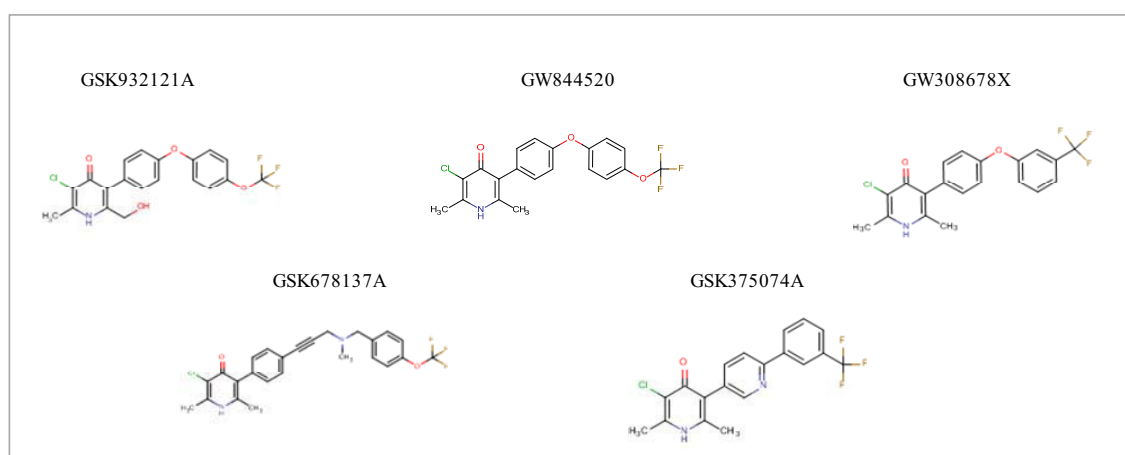


Figura 20: 4(1H)-piridonas seleccionadas para estudiar su perfil antimalárico.

El complejo III o citocromo *bc1* (complejo ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa) es esencial para el parásito ya que su actividad catalítica es crucial para el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial así como para la reoxidación del ubiquinol, necesario para la biosíntesis de pirimidinas (Figura 21).

Para estudiar la selectividad de la diana *bc1*, la inhibición de la actividad de la ubiquinol-citocromo c reductasa fue determinada en mitocondrias aisladas de *P. falciparum* y en mitocondrias de origen mamífero, aisladas de la línea celular humana HEK293 (Tabla 7).

Los valores de IC_{50} obtenidos para las 4(1H)-piridonas en mitocondrias aisladas de *P. falciparum*, fueron de 0,001 μ M a 0,04 μ M, según el derivado ensayado. Los datos obtenidos en mitocondrias humanas fueron de 0,20 μ M a 0,52 μ M en rango similar a la atovaquona, salvo el derivado GSK375074A que tuvo un valor de 3,67 μ M. El ratio de selectividad específico de la ubiquinol-citocromo c reductasa de *P. falciparum* fue también calculado, concluyendo que las 4(1H)-piridonas son inhibidores selectivos del complejo *bc1* de *Plasmodium*, con ratios que van desde más de 40 veces hasta más de

400 veces, sobre la inhibición de la actividad de la enzima en mamíferos, según el derivado ensayado.

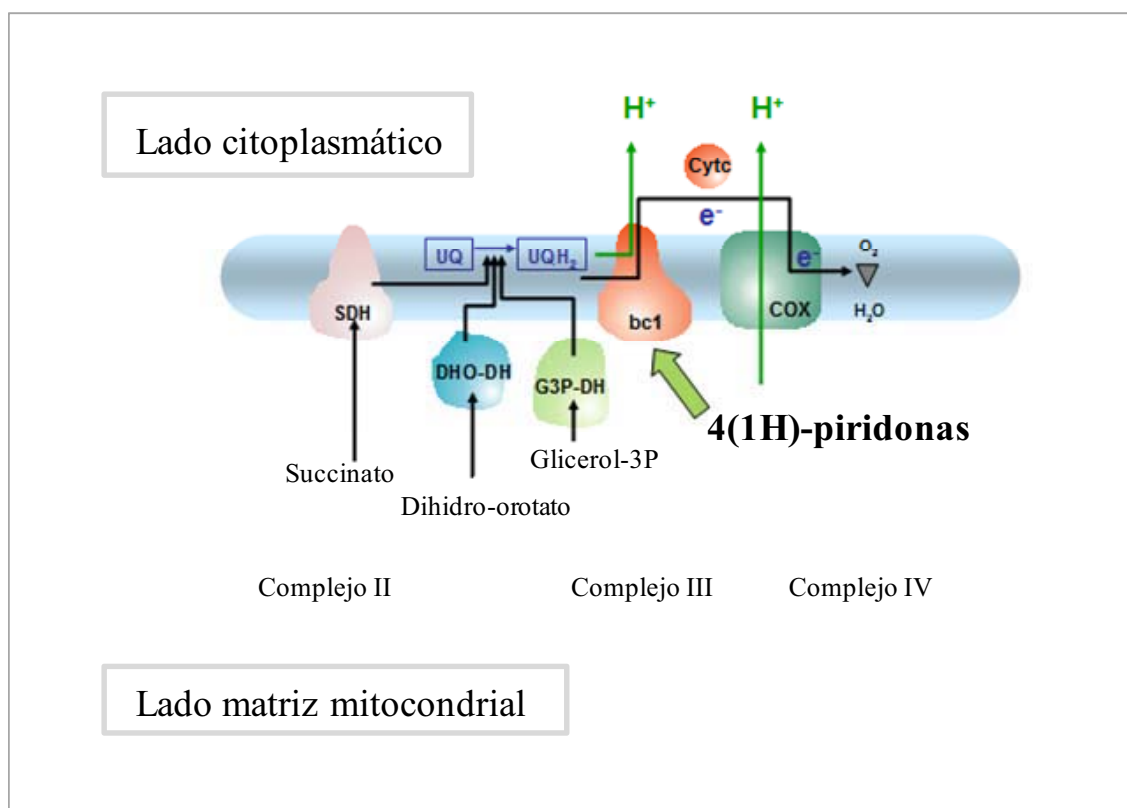


Figura 21: Cadena electrónica del transporte mitocondrial de *Plasmodium*. El sitio de acción de las 4(1H)-piridonas está señalado con una flecha verde. SDH: Succinato deshidrogenasa (Complejo II); DHO-DH: Dihidro-orotato deshidrogenasa; G3P-DH: Glicerol -3-fostato-deshidrogenasa; UQ: Ubiquinona; UQH₂: Ubihidroquinona; bc1: citocromo bc1: complejo ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa (Complejo III); CytC: Citocromo C; COX: Citocromo Oxidasa (Complejo IV).

4.2.2. Actividad antimalárica en célula entera

La potencia y selectividad de las 4(1H)-piridonas también se determinó a nivel de célula entera. Para ello, las 4(1H)-piridonas fueron ensayadas en distintas cepas de *P. falciparum* con distintos perfiles antimaláricos en cuanto a sensibilidad o resistencia a diversos antimaláricos clásicos se refiere, siguiendo el método de incorporación de [³H]-hipoxantina (Tabla 8).

Las 4(1H)-piridonas ensayadas fueron extremadamente potentes contra las formas eritrocíticas de *P. falciparum* en la cepa 3D7, usada de rutina en el laboratorio;

especialmente el derivado GSK678137A con una IC_{50} de $0,0005\mu\text{g/mL}$, en rango equivalente a la atovaquona cuya IC_{50} fue $0,0004\mu\text{g/mL}$. La potencia de las 4(1H)-piridonas se mantuvo también frente a cepas resistentes a diversos antimaláricos comerciales, presentando actividad frente a cepas resistentes a atovaquona (FCR3-A), pirimetamina (HB3), cloroquina-pirimetamina (K1,W2) y cloroquina-pirimetamina-mefloquina (Dd2).

4.2.3. Citotoxicidad

La posible citotoxicidad de las 4(1H)-piridonas fue evaluada en líneas celulares de mamífero. Los resultados están expresados en valores de Tox_{50} (concentración de compuesto que se necesita para producir una disminución en la reducción de resazurina equivalente a un 50%), ya que la metodología de este ensayo está basada en la medida de fluorescencia que se produce en la reducción de resazurina a resorufina (Tabla 9).

Tabla 9. Citotoxicidad de las 4(1H)-piridonas. Los resultados están expresados como la media de tres ensayos distintos, cada uno de ellos por duplicado. *Cálculo de la selectividad a nivel celular: ratio Tox_{50} HepG2/ IC_{50} 3D7

Citotoxicidad en líneas celulares de mamífero Tox_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					
Líneas Celulares	GSK932121A	GW308678X	GW844520	GSK678137A	GSK375074A
HepG2 (hígado, humano)	>10	>2,5	>1,25	>2,5	>2,5
H9C2 (miocardio, rata)	>10	>2,5	>1,25	>2,5	>2,5
Selectividad Celular*	3333	1250	313	4902	175

Las 4(1H)-piridonas no mostraron citotoxicidad en las líneas celulares ensayadas, siendo $2,5\mu\text{g/mL}$ la máxima solubilidad posible alcanzada en el medio de cultivo celular, salvo para el compuesto GSK932121A que se alcanzó la solubilidad de $10\mu\text{g/mL}$. La mayor selectividad celular se obtuvo para los compuestos GSK678137A y GSK932121A.

Tabla 7. Inhibición y ratio de selectividad en la diana *bc1* de las 4(1H)-piridonas seleccionadas. *Ratio calculado: IC₅₀ HEK293/IC₅₀ *P. falciparum*, siendo la IC₅₀ la concentración media mínima inhibitoria.

IC ₅₀ (μM) Inhibición del complejo <i>bc1</i> en mitocondrias aisladas					
	GSK932121A	GW308678X	GW844520	GSK678137A	GSK375074A
Células humanas HEK293	0,39 ± 0,08	0,52 ± 0,05	0,20 ± 0,04	0,42 ± 0,09	3,67 ± 0,64
<i>P. falciparum</i> 3D7	0,009 ± 0,001	0,002 ± 0,0004	0,002 ± 0,0001	0,001 ± 0,001	0,035 ± 0,006
Ratio selectividad diana*	43	260	100	420	105
					3400

Tabla 8. Actividad en célula entera de las 4(1H)-piridonas contra cepas de *P. falciparum* sensibles^(S) y resistentes^(R) a antimaláricos clásicos (CQ-Cloroquina; ATOV-Atovaquona; PIR-Pirimetamina; MQ: Mefloquina). Los resultados están expresados como la media ± desviación estándar de cuatro ensayos distintos, siguiendo el protocolo de incorporación de [³H]-hipoxantina en un tiempo total de ensayo de 48 horas.

Inhibición en célula entera <i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (μg/mL)							
Cepas	GSK932121A	GW308678X	GW844520	GSK678137A	GSK375074A	Atovaquona	Primetamina
3D7 ^(S)	0,003 ± 0,0003	0,002 ± 0,0010	0,004 ± 0,0012	0,0005 ± 0,0002	0,014 ± 0,0018	0,0004 ± 0,0002	0,006 ± 0,0002
FCR3-A (CQ ^R , ATOV ^R)	0,007 ± 0,0004	0,002 ± 0,0002	0,003 ± 0,0003	0,0003 ± 0,00003	0,010 ± 0,0004	0,64 ± 0,10	0,004 ± 0,0015
K1 (CQ ^R , PIR ^R)	0,003 ± 0,0002	0,002 ± 0,00005	0,004 ± 0,0001	0,0007 ± 0,0001	0,015 ± 0,00006	0,0002 ± 0,00001	4,7 ± 0,073
Dd2 (CQ ^R , PIR ^R , MQ ^R)	0,003 ± 0,0002	0,002 ± 0,0004	0,003 ± 0,0002	0,0008 ± 0,0001	0,018 ± 0,001	0,0002 ± 0,00001	14,39 ± 0,31
HB3 (PIR ^R)	0,002 ± 0,00001	0,002 ± 0,0001	0,004 ± 0,0001	0,0006 ± 0,00001	0,014 ± 0,0001	0,0001 ± 0,00001	0,84 ± 0,06
W2 (CQ ^R , PIR ^R)	0,003 ± 0,0002	0,003 ± 0,0006	0,005 ± 0,0018	0,0007 ± 0,0001	0,019 ± 0,0016	0,0002 ± 0,00003	11,43 ± 0,72

4.2.4. Actividad sobre formas asexuales eritrocíticas

Para poder estudiar la susceptibilidad de los distintos estadios eritrocíticos asexuales de *P. falciparum*, a una serie de 4(1H)-piridonas así como a los antimaláricos comerciales seleccionados, en primer lugar se determinaron las concentraciones que inhibían al 50% ó 90% de los parásitos (IC₅₀ e IC₉₀ respectivamente) por el método de incorporación de [³H]-hipoxantina (Tabla 10).

Tabla 10. Inhibición en la incorporación de [³H]-hipoxantina de parásitos de *P. falciparum* (cepa 3D7).

Inhibición en la incorporación de [³ H]-hipoxantina		
Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₀ (µg/mL)
GSK932121A	0,0033 ± 0,0003	0,0074 ± 0,0008
GW308678X	0,0022 ± 0,0010	0,0068 ± 0,0005
GSK678137A	0,0005 ± 0,0002	0,0033 ± 0,0015
GSK375074A	0,0143 ± 0,0018	0,0440 ± 0,0005
Artemisinina	0,0036 ± 0,0009	0,0069 ± 0,0009
Quinina	0,0603 ± 0,0045	0,4816 ± 0,0008
Cloroquina	0,0132 ± 0,0003	0,0343 ± 0,0005
Mefloquina	0,0167 ± 0,00003	0,0459 ± 0,0012
Atovaquona	0,0004 ± 0,0002	0,0043 ± 0,0022

En segundo lugar se realizó el ensayo de especificidad de forma siguiendo el esquema descrito en la Figura 22. Los efectos del ensayo de especificidad de forma se evaluaron por tres métodos distintos, incorporación de [³H]-hipoxantina, citometría de flujo y microscopía óptica, ya que por las características y ventajas propias que pueden aportar cada método, se puede obtener de forma complementaria un mejor conocimiento de la distinta sensibilidad que cada estadio distinguible morfológicamente de *P. falciparum*, presenta a diversos antimaláricos comerciales y a nuevas entidades químicas (Anexo III).

4.2.4.1. Método de incorporación de [³H]-hipoxantina

Los efectos de las 4(1H)-piridonas en la incorporación de [³H]-hipoxantina, sobre los seis estadios específicos de *P. falciparum*, anillo joven (AJ), anillo viejo (AV), trofozoíto joven (TJ), trofozoíto viejo (TV), esquizonte joven (EJ) y esquizonte viejo

(EV), tras 5 horas de exposición, fueron representados como el porcentaje de inhibición, respecto a un cultivo control sin tratar, para cada estadio específico (Figura 23).

Las 4(1H)-piridonas seleccionadas para el ensayo de especificidad de forma no tuvieron efecto sobre los anillos jóvenes y mostraron una baja inhibición, del 30%, frente a los anillos viejos.

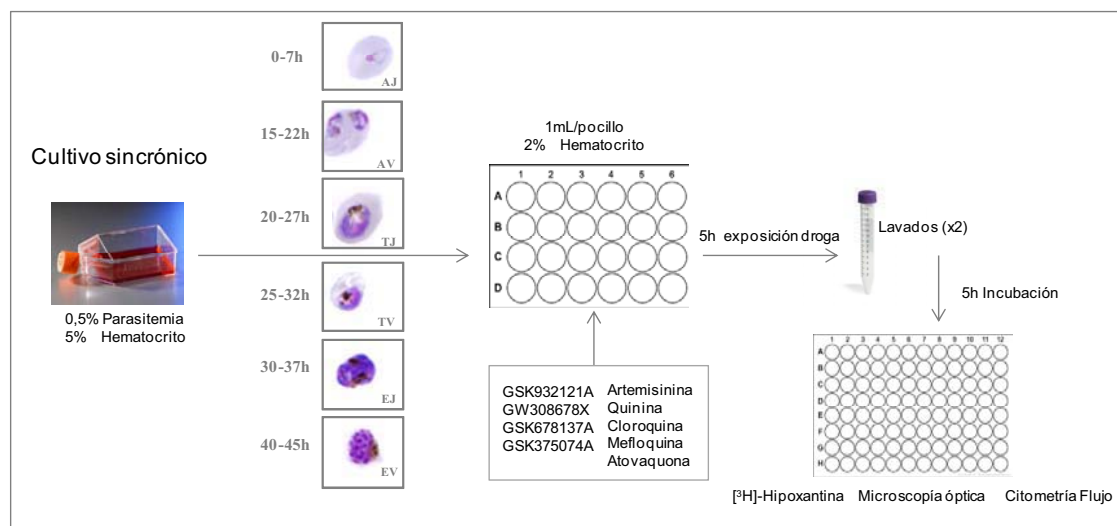


Figura 22: Representación esquemática del ensayo de especificidad de forma de estadios asexuales de *P. falciparum*. (AJ: anillo joven; AV: anillo viejo; TJ: trofozoíto joven; TV: trofozoíto viejo; EJ: esquizonte joven; EV: esquizonte viejo). Los compuestos fueron ensayados a concentraciones que causan un 90-95% de inhibición (Tabla 10).

Su efecto fue mayor contra las formas maduras, especialmente trofozoítos viejos y esquizontes jóvenes. Los rangos de inhibición frente a los estadios maduros en concreto, varían del 43% al 62% para los trofozoítos jóvenes, del 61% al 77% para los trofozoítos viejos, del 62% al 72% para los esquizontes jóvenes y del 40% al 48% para los esquizontes viejos, según el compuesto ensayado. Estos resultados se obtuvieron de forma similar en el caso de la quinina, que predominantemente actuó sobre los trofozoítos y esquizontes, obteniéndose un porcentaje de inhibición del 72% y 87% para los trofozoítos jóvenes y viejos respectivamente y del 77% y 56% para los esquizontes jóvenes y viejos respectivamente; mientras que no demostró actividad frente a los anillos jóvenes. La artemisinina mostró efecto frente a las formas jóvenes y esquizontes, obteniéndose un 59% de inhibición para los anillos jóvenes y un 62% de inhibición para los esquizontes viejos.

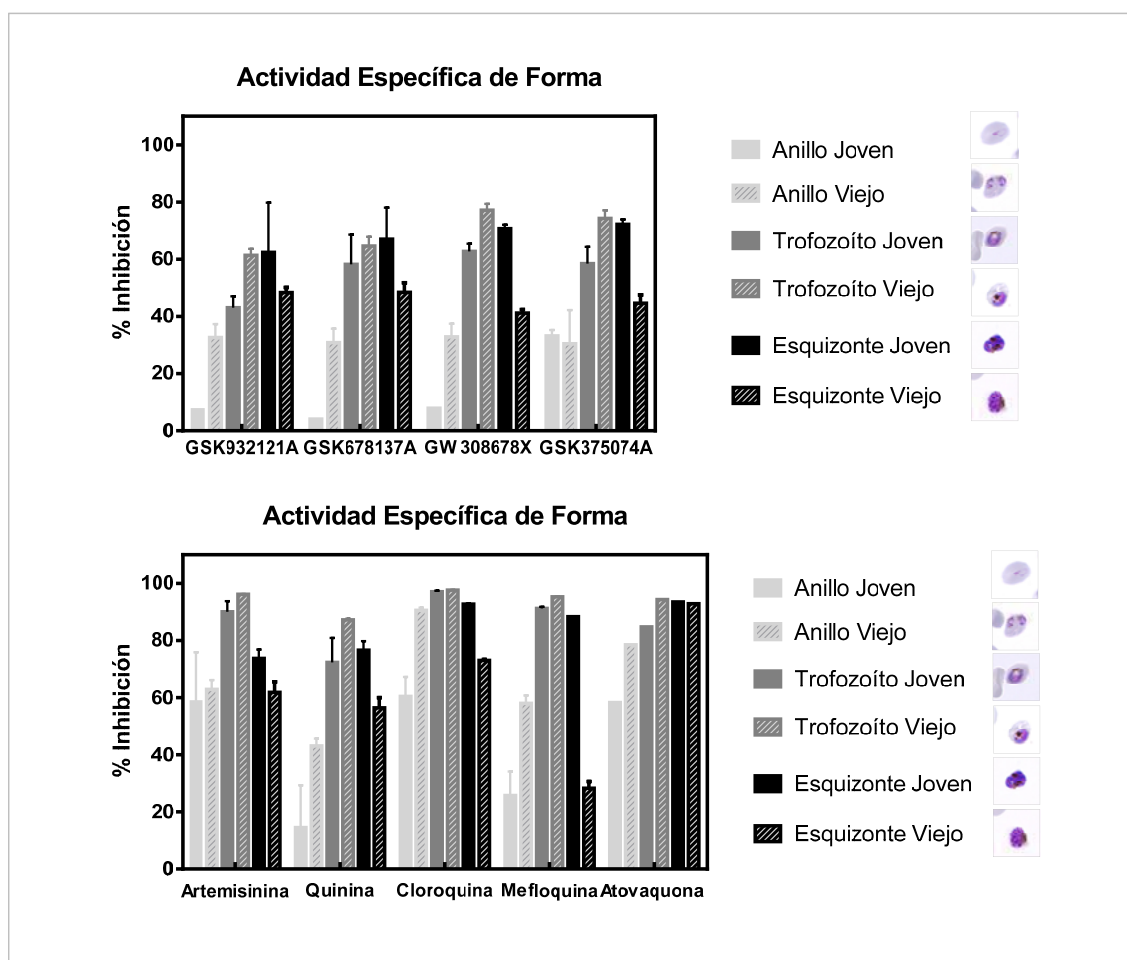


Figura 23: Actividad de las 4(1H)-piridonas y antimaláricos comerciales contra los distintos estadios asexuales de *P. falciparum*. (El color gris claro representa al estadio de anillos, el gris oscuro a los trofozoítos y el negro a los esquizontes; Patrón liso: estadios jóvenes; Patrón con rayas: estadios viejos). Cada barra representa la media y desviación estándar de $n=3$ ensayos.

Se observó un incremento en su efecto frente a los trofozoítos, con unos porcentajes de inhibición mayores, siendo del 90% y 96% para trofozoítos jóvenes y viejos respectivamente. En el caso de la cloroquina se observó una mayor inhibición frente a las formas maduras, siendo el porcentaje de inhibición del 98% frente a los trofozoítos y de un 83% en el caso de los esquizontes, así como algo de inhibición contra los estadios jóvenes, especialmente contra anillos viejos siendo la inhibición del 91%. La mefloquina demostró actividad contra las formas maduras: trofozoítos jóvenes, trofozoítos viejos y esquizontes jóvenes, con porcentajes de inhibición del 91%, 95%, y 88% respectivamente. Mientras que no se observó ningún efecto en anillos jóvenes ni en esquizontes viejos, obteniéndose un porcentaje de inhibición del 26% y 28% respectivamente. El efecto contra anillos viejos fue ligeramente moderado, con una

inhibición del 58%. La atovaquona resultó activa contra los estadios maduros, trofozoítos viejos y esquizontes jóvenes, llegando a un 94% de inhibición en estos estadios, mientras que su efecto en las formas jóvenes fue inferior siendo los porcentajes de inhibición del 58% y 78% para anillos jóvenes y viejos, respectivamente.

4.2.4.2. Método de microscopía óptica

El mayor efecto observado por microscopía óptica de los derivados de las 4(1H)-piridonas sobre los distintos estadios asexuales, fue también sobre las formas maduras de trofozoítos viejos y esquizontes jóvenes (Figura 24). Los rangos de inhibición obtenidos fueron del 29% al 42% para los anillos jóvenes, del 33% al 48% para los anillos viejos, del 22% al 47% para los trofozoítos jóvenes, del 30% al 63% para los trofozoítos viejos, del 38% al 57% para los esquizontes jóvenes y del 41% al 54% para los esquizontes viejos, dependiendo del compuesto ensayado. Se apreciaron a su vez, cambios morfológicos producidos tras el corto tiempo de exposición (5 horas), siendo la proporción de parásitos afectados variable entre el 13% y el 33% para los trofozoítos viejos y del 15% al 25% en el caso de los esquizontes jóvenes.

Los trofozoítos viejos se observaron más pequeños y morfológicamente alterados, con una vacuola parasitófora más pálida y grande en el caso de los trofozoítos viejos tratados con los compuestos GSK932121A, GSK375074A y GW308678X. Los trofozoítos viejos tratados con el compuesto GSK678137A evolucionaron hacia formas picnóticas mientras que los tratados con el compuesto GW308678X mostraron alteraciones en la membrana del parásito. Tras 5 horas de incubación, los trofozoítos viejos del cultivo control no tratado, evolucionaron hacia esquizontes jóvenes apreciándose el pigmento de color marrón oscuro característico de este estadio así como un citoplasma más pálido del eritrocito. En cambio, los trofozoítos viejos tratados con los derivados de las 4(1H)-piridonas no progresaron a esquizontes jóvenes, quedando secuestrados en el estadio en el que el tratamiento comenzó (trofozoítos viejos). En el caso de los esquizontes jóvenes, el cultivo control no tratado evolucionó a esquizonte viejo, observándose más de tres núcleos en su interior, después de las 5 horas de incubación. A su vez, los parásitos tratados con las 4(1H)-piridonas no progresaron a esquizontes viejos. En estos estadios (EJ), también se observaron cambios morfológicos, tales como alteraciones en la membrana de los cultivos tratados con los compuestos GSK678137A, GSK375074A y GW308678X. En el caso de los cultivos

tratados con los compuestos GSK932121A y GSK678137A se observaron parásitos más pequeños que evolucionaron hacia formas picnóticas.

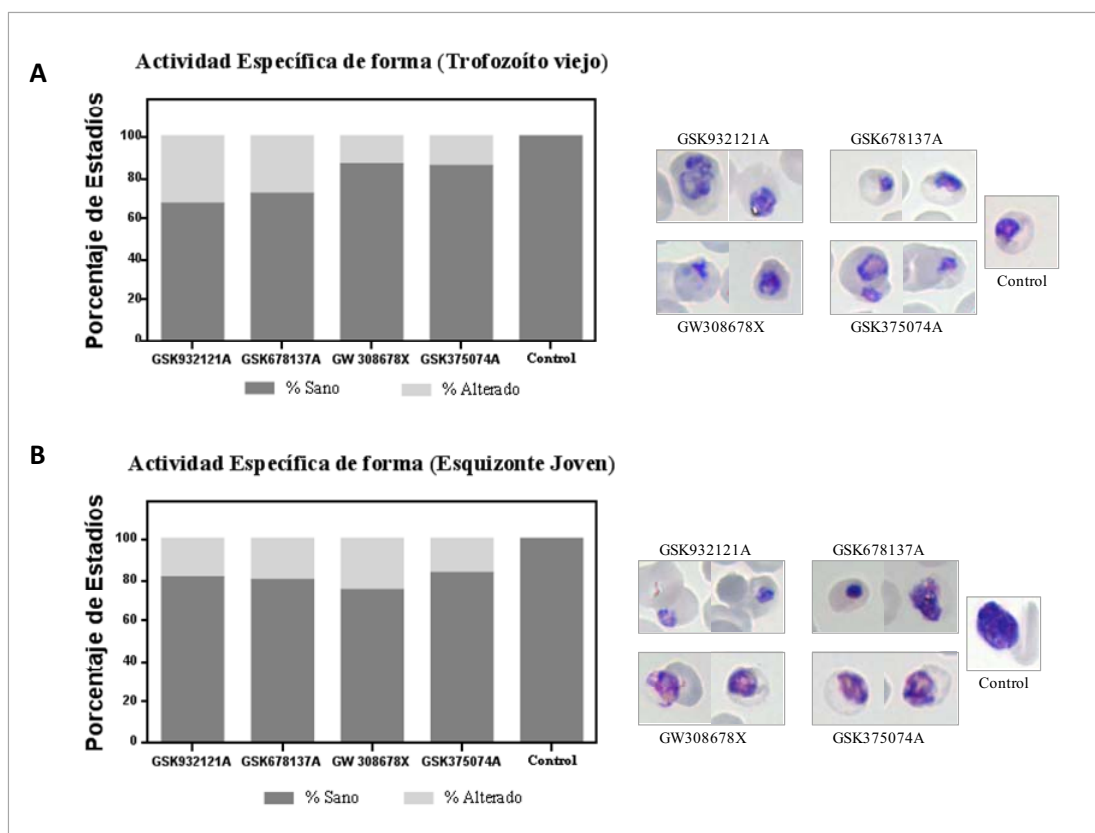


Figura 24. Resultado del análisis por microscopía óptica de los trofozoítos viejos (A) y esquizontes jóvenes (B) tras la exposición de 5 horas a las 4(1H)-piridonas seleccionadas. A la izquierda de la figura se representa el porcentaje de parásitos sanos y alterados para cada estadio en concreto, según el compuesto ensayado. A la derecha de la figura se muestran los cambios morfológicos observados tras la exposición a las 4(1H)-piridonas.

4.2.4.3. Método de citometría de flujo

El patrón de marcaje tipo bidimensional FL2-H/YOYO-1 para los estadios más afectados (trofozoítos viejos y esquizontes jóvenes), tras 5 horas de tratamiento, se representa en la Figura 25.

Los resultados obtenidos por el análisis de citometría de flujo fueron similares a los observados por microscopía óptica. Los rangos de inhibición varían del 37% al 82% en el caso de los trofozoítos viejos y del 54% al 60% para los esquizontes jóvenes, según los compuestos ensayados.

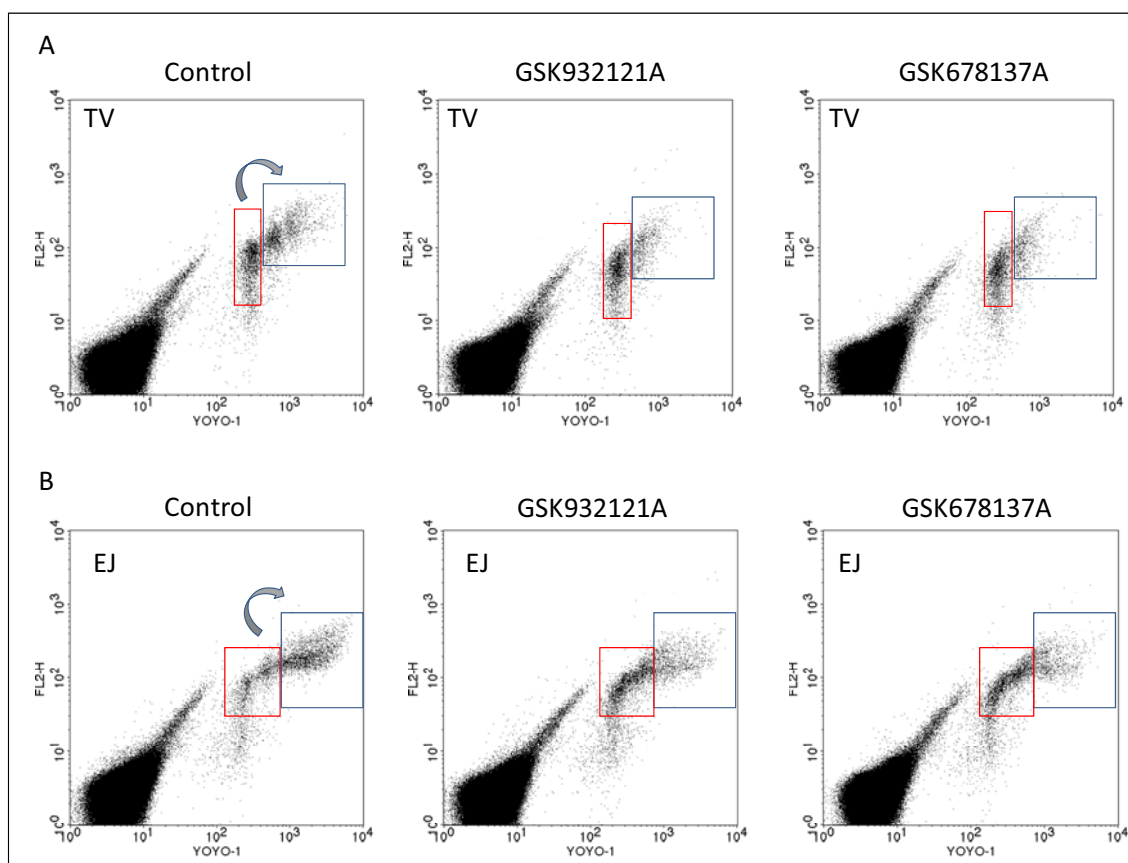


Figura 25. Efecto de las 4(1H)-piridonas sobre los trofozoitos viejos (TV) y esquizontes jóvenes (EJ), comparado con un cultivo control no tratado y medido por citometría de flujo. Las áreas recuadradas muestran el mayor efecto observado para cada estadio específico (TV y EJ). La flecha gris representa la progresión del estadio correspondiente durante las 5 horas de incubación de trofozoito viejo a esquizonte joven (A) y de esquizonte joven a esquizonte viejo (B) respectivamente.

El efecto inhibitorio observado sobre las formas jóvenes fue menor, del 5% al 10% para los anillos jóvenes, del 10% al 42% para los anillos viejos y ligeramente superior en los esquizontes viejos, siendo el rango de inhibición en este caso del 30% al 60%.

El cultivo control no tratado, evolucionó en las 5 horas de incubación al estadio siguiente correspondiente, de trofozoito viejo a esquizonte joven (Figura 25A) y de esquizonte joven a esquizonte viejo (Figura 25B), respectivamente.

Los estadios eritrocíticos asexuales más sensibles a los efectos de las 4(1H)-piridonas fueron las formas maduras, en concreto los trofozoitos viejos y los esquizontes jóvenes. Estos resultados fueron obtenidos de forma similar por los tres

métodos de análisis empleados: incorporación de [^3H]-hipoxantina, microscopía óptica y citometría de flujo.

4.2.5. Velocidad de acción

El valor de inhibición que un compuesto tiene a lo largo del tiempo es un factor importante a considerar para poder optimizar posteriormente su eficacia. Por este motivo se determinó por el método de incorporación de [^3H]-hipoxantina, el tiempo que las 4(1H)-piridonas seleccionadas, necesitaban para alcanzar la máxima inhibición (Figura 26).

La inhibición de las 4(1H)-piridonas sobre el crecimiento del parásito aumentó gradualmente con el tiempo de exposición. Se define como T_{50} , el tiempo de exposición requerido para que un compuesto produzca el 50% de inhibición sobre los parásitos expuestos; A su vez el T_{90} será el tiempo requerido para producir el 90% de inhibición. Ambos valores fueron calculados para las 4(1H)-piridonas estudiadas (Tabla 11).

Se observó un mayor efecto en el intervalo de tiempo que va entre las 16 y 24 horas según el compuesto ensayado, correspondiendo ese intervalo con la mayor maduración de los parásitos.

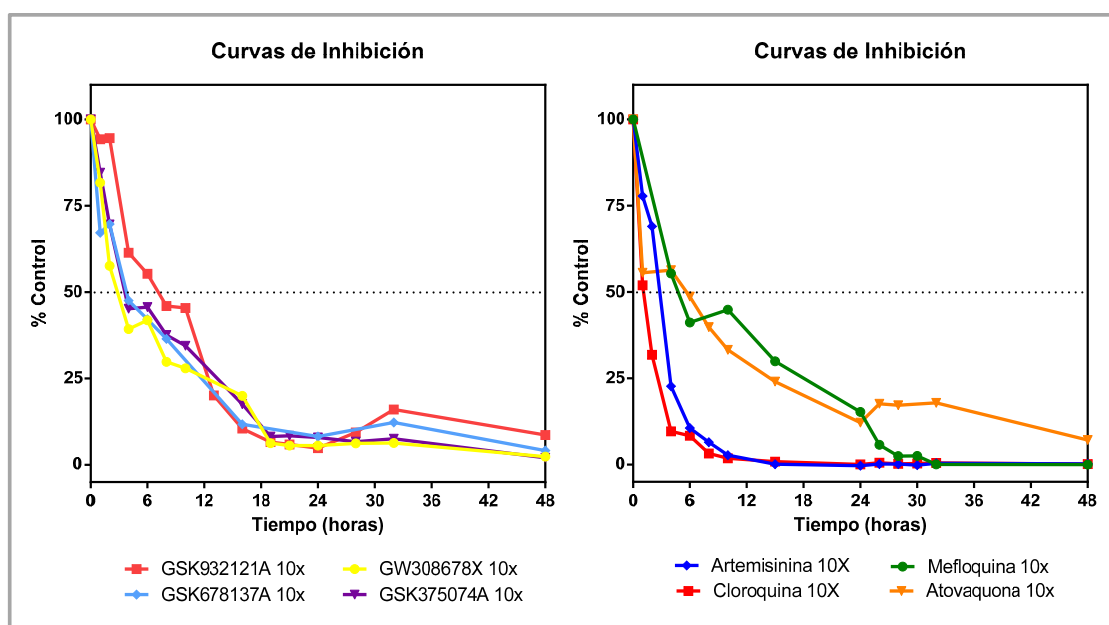


Figura 26. Curvas de inhibición en el tiempo de las 4(1H)-piridonas. Los parásitos fueron expuestos durante 48 horas a las 4(1H)-piridonas y antimaláricos seleccionados (a una concentración equivalente al valor de su $\text{IC}_{50} \times 10$). A determinados tiempos de incubación se procesaron las muestras para medir su incorporación de [^3H]-hipoxantina.

Tabla 11. Tiempo de acción de las 4(1H)-piridonas.

Tiempo de acción (horas) de las 4(1H)-piridonas				
	GSK932121A	GW308678X	GSK678137A	GSK375074A
T ₅₀	8	2	4	2
T ₉₀	16	19	24	19

Respecto a los antimaláricos comerciales, la cloroquina y artemisinina, se comportaron como drogas rápidas ya que su T₉₀ se alcanzó a las 2 y 4 horas, respectivamente, actuando por tanto sobre las formas jóvenes (anillos). Mientras que la mefloquina y atovaquona serían drogas más lentas, alcanzándose su T₉₀ a las 26 y 48 horas respectivamente. Las 4(1H)-piridonas serían por tantos unos compuestos más lentos que la cloroquina y artemisinina, afectando fundamentalmente a los estadios maduros, trofozoitos viejos y esquizontes jóvenes.

4.2.6. Actividad sobre formas sexuales eritrocíticas (gametocitos)

Con el objetivo de valorar si las 4(1H)-piridonas podían actuar bloqueando la transmisión, se estudió el efecto sobre las formas sexuales o gametocitos de *P. falciparum* del compuesto más avanzado del proyecto, GSK932121A. Para ello se obtuvieron los gametocitos con la cepa NF54 de *P. falciparum* (según el procedimiento explicado en el punto 4.1.2.) y se evaluó la actividad gametocitocida y el efecto en el retraso de la maduración de los gametocitos jóvenes (Figuras 27 y 28 respectivamente).

El compuesto GSK932121A no presentó actividad gametocitocida, tal y como se observa en la curva dosis-respuesta, al igual que la doxiciclina empleada como control negativo del ensayo. La dihidroartemisinina, descrita como gametocitocida en formas jóvenes, tuvo un valor de IC₅₀ de 0,8 ng/mL.

Respecto al retraso en la maduración de los gametocitos (Figura 28), concentraciones de dihidroartemisinina mayores al valor de su IC₅₀ (0,8 ng/mL), provocaron que los gametocitos no evolucionasen quedándose en estadios jóvenes (II y III). Mientras que en concentraciones inferiores, se observó una evolución en mayor proporción al estadio III, aunque con retraso respecto al control no tratado.

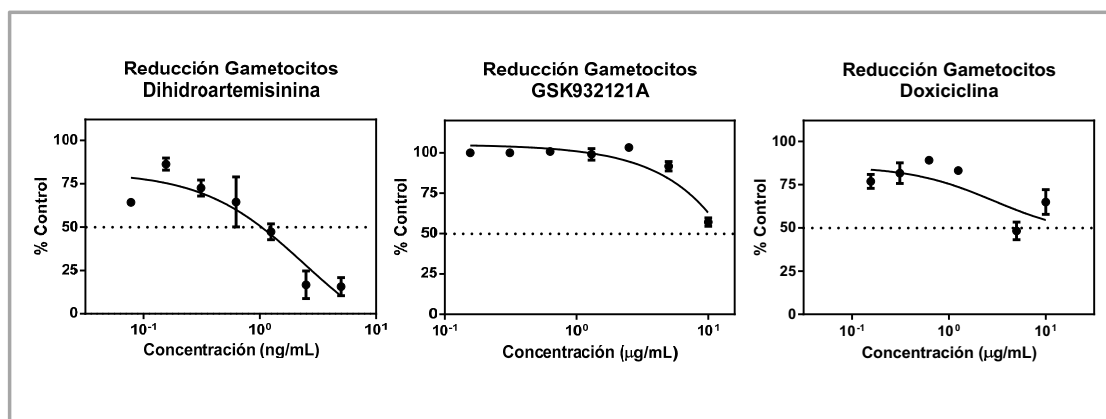


Figura 27. Actividad gametocitocida de las 4(1H)-piridonas. Gametocitos jóvenes (estadios II y III) fueron expuestos durante 48 horas a distintas concentraciones del compuesto GSK932121A, dihidroartemisinina (control positivo) y doxiciclina (control negativo), valorándose por microscopía óptica el posible efecto en el bloqueo de la transmisión, a un tiempo final de ensayo de 72 horas (48 horas de exposición + 24 horas de recuperación sin exposición al compuesto). Se representa la media y desviación estándar de n=3 ensayos.

El compuesto GSK932121A y la doxiciclina, evolucionaron hacia formas más maduras (mayoría de estadio III y ligera presencia de estadios IV, independientemente de la concentración ensayada) sin llegar a la maduración del cultivo control no tratado, por lo que su efecto sería retrasando ligeramente la maduración pero sin llegar a inhibir de forma máxima el crecimiento de los gametocitos, ya que no se obtuvo a las concentraciones ensayadas un valor de IC_{50} ni de IC_{90} para el compuesto GSK932121A ni para la doxiciclina.

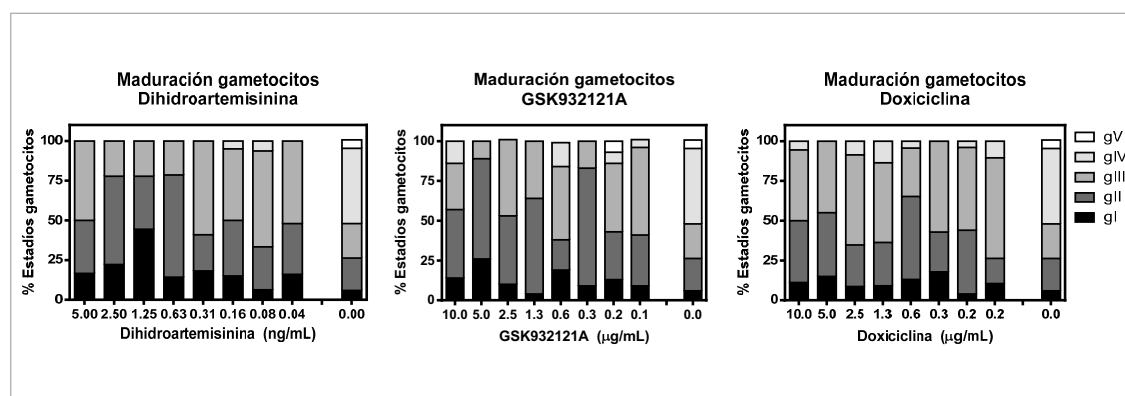


Figura 28. Efecto de las 4(1H)-piridonas en la maduración de los estadios jóvenes de gametocitos. (Se evaluó el compuesto GSK932121A, la dihidroartemisinina como control positivo y la doxiciclina como control negativo; Estadio I (gI); estadio II (gII), estadio III (gIII), estadio IV (gIV), estadio V (gV) de gametocitos).

4.2.7. Ensayo de combinaciones de las 4(1H)-piridonas con otros antimaláricos

Con el fin de reducir la aparición de resistencias y alargar la vida útil de los antimaláricos, el consenso actual en la comunidad científica, es administrarlos en combinación. Por este motivo, los compuestos más avanzados del proyecto, fueron ensayados en combinación con una serie de antimaláricos comerciales: atovaquona, artemisinina, cloroquina, pirimetamina y proguanil, con el fin de averiguar si podrían existir sinergias o antagonismos al administrarlos conjuntamente. Como control interno del ensayo se usó la combinación atovaquona-proguanil que ha sido descrita como sinérgica tanto *in vitro* como *in vivo*. Se emplearon cepas sensibles (3D7) y resistentes (K1, FCR3-A) para comprobar el efecto en combinación por el método del “tablero de ajedrez”. Se determinaron los valores de IC_{50} de los compuestos ensayados, tanto solos como en combinación, calculándose a partir de éstos, los valores de la concentración inhibitoria fraccional (*FIC*).

Para obtener valores numéricos de la clase de interacción existente los datos se expresaron como suma de *FICs* (Sum *FIC*), considerándose la combinación sinérgica (Sum*FIC*<0,5), cuando el efecto de los dos compuestos combinados es significativamente mayor que el efecto de cada compuesto por separado; aditiva (Sum*FIC*= 0,5-1), cuando el resultado observado con las drogas combinadas es la suma de los resultados que cada droga aporta por separado; indiferente (Sum*FIC*=1-2), cuando el efecto de las drogas en combinación es simplemente el efecto de la droga que es más activa por separado; y antagonista (Sum*FIC*>2), cuando el efecto combinado de los dos compuestos es significativamente menor que el efecto de cada droga por separado (Tabla 12).

La interacción de las 4(1H)-piridonas seleccionadas con antimaláricos comerciales tales como artemisinina, cloroquina, pirimetamina y proguanil, fue predominantemente aditiva para el compuesto GW308678X e indiferente para el compuesto GSK932121A. No se observó en ninguna de las combinaciones ensayadas efectos antagonistas. Cabe destacar además que no se observó sinergia en la combinación de las 4(1H)-piridonas con el proguanil, a diferencia de la combinación atovaquona-proguanil, lo que sugiere un posible mecanismo de acción diferente al de la atovaquona.

Tabla 12. Interacción de la combinación de las 4(1H)-piridonas seleccionadas con antimaláricos comerciales contra cepas *in vitro* de *P. falciparum*. (a) El valor de SumFIC se calcula como el valor de IC₅₀ del compuesto A en combinación/IC₅₀ compuesto A solo + compuesto B en combinación/IC₅₀ compuesto B solo. (b) Tipo de interacción: aditiva (AD), indiferente (IND). (Los ensayos se realizaron un total de n=3 veces).

Compuesto combinado	Cepa	GSK932121A		GW308678X	
		Sum FIC ^(a)	Interacción ^(b)	Sum FIC ^(a)	Interacción ^(b)
Atovaquona	3D7A	1 ± 0,1	AD	0,7 ± 0,1	AD
	K1	1,1 ± 0,07	IND	0,7 ± 0,1	AD
	FCR3-A	1,1 ± 0,07	IND	0,61 ± 0,1	AD
Artemisinina	3D7A	1,2 ± 0,17	IND	0,78 ± 0,3	AD
	K1	1,1 ± 0,25	IND	1 ± 0,4	AD
	FCR3-A	1,1 ± 0,13	IND	0,9 ± 0,3	AD
Cloroquina	3D7A	1,2 ± 0,21	IND	0,68 ± 0,2	AD
	K1	1,3 ± 0,28	IND	0,84 ± 0,3	AD
	FCR3-A	1,2 ± 0,2	IND	1 ± 0,3	AD
Pirimetamina	3D7A	1,1 ± 0,12	IND	0,72 ± 0,2	AD
	K1	1,1 ± 0,17	IND	0,8 ± 0,3	AD
	FCR3-A	1,2 ± 0,16	IND	1 ± 0,3	AD
Proguanil	3D7A	1,1 ± 0,12	IND	1,1 ± 0,4	IND
	K1	1,1 ± 0,19	IND	0,9 ± 0,2	AD
	FCR3-A	0,9 ± 0,1	AD	0,8 ± 0,2	AD
Atovaquona/Proguanil	3D7A	0,5 ± 0,2	SINERGIA	0,5 ± 0,2	SINERGIA

4.2.8. Recrudescencia *in vitro*

Con el objetivo de estudiar la capacidad *in vitro* de las 4(1H)-piridonas para reducir la viabilidad de los parásitos de *P. falciparum*, los cultivos fueron expuestos durante tres días, tiempo de tratamiento recomendado para malaria. El efecto de los compuestos GSK932121A y GW308678X se estudió a diferentes concentraciones. Transcurrido el tiempo de exposición (72 horas), se evaluó la capacidad de recrudescencia o de reaparición de los parásitos, evaluándose la parasitemia de los cultivos (por tinción Giemsa), hasta alcanzar una parasitemia en el flask del 5% o se llegase al tiempo final del ensayo (28 días), (Figura 29).

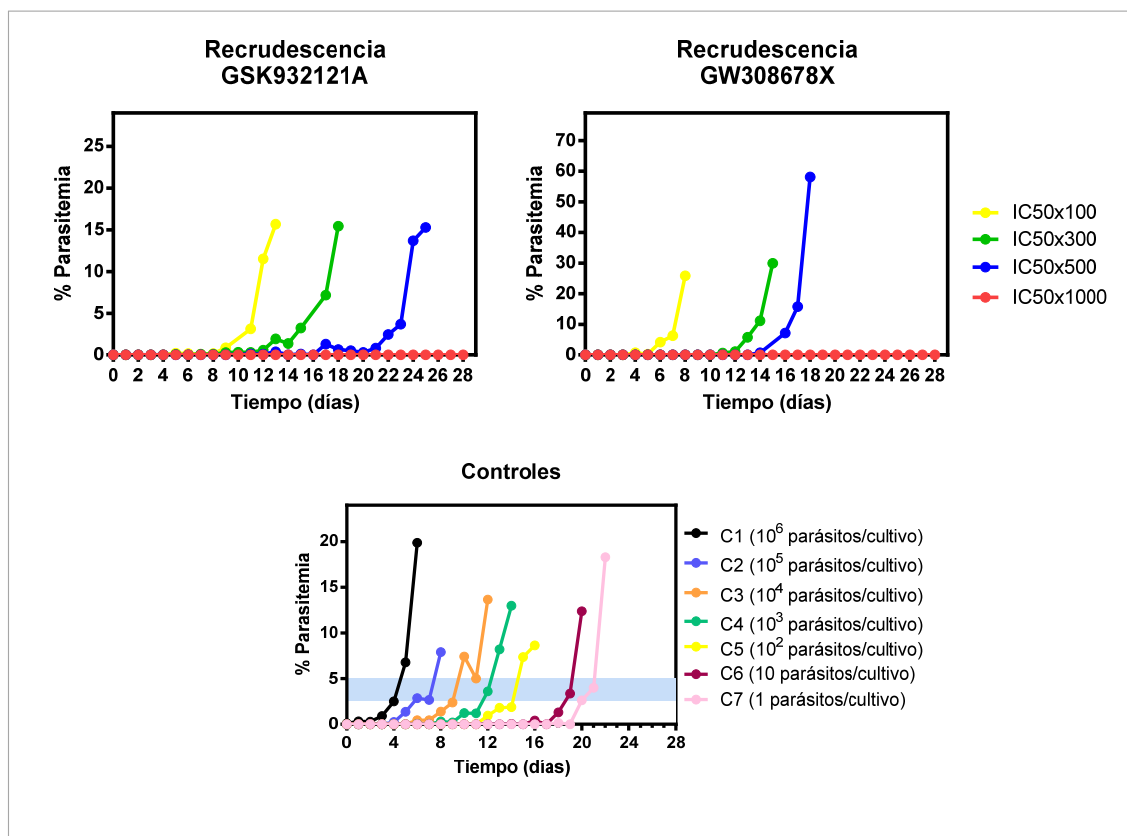


Figura 29. Recrudescencia *in vitro* de las 4(1H)-piridonas. Los parásitos fueron expuestos a distintas concentraciones ($IC_{50} \times 100$, $IC_{50} \times 300$, $IC_{50} \times 500$ e $IC_{50} \times 1000$) de las 4(1H)-piridonas seleccionadas, durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de exposición se retiró la droga y los parásitos fueron transferidos a flasks nuevos cultivándose un tiempo total de 28 días o hasta que alcanzasen parasitemias del 5% (cambiándoles el medio cada 48 horas y añadiendo eritrocitos frescos cada 96 horas; Los cultivos controles se llevaron en paralelo para determinar el tiempo que tardaban en aparecer los parásitos, según la cantidad inicial de parásitos que tuviese cada cultivo control). Se representa la media de $n=3$ ensayos con una desviación estándar menor del 5%.

De las 4(1H)-piridonas ensayadas, el compuesto GSK932121A presentó un ligero retraso en la reaparición de parásitos (respecto al otro compuesto). Si bien a la mayor concentración ensayada ($IC_{50} \times 1000$) no se observó reaparición de parásitos con ninguno de los dos compuestos, pudiendo indicar que los parásitos ya no eran viables y siendo por tanto la $IC_{50} \times 1000$ la dosis necesaria para evitar la reaparición de los parásitos, provocando por tanto una cura total (Tabla 13).

Los cultivos controles nos indicaban el tiempo que tardaba la distinta cantidad de parásito remanente en aparecer. De esta forma, se pudo valorar cuánto parásito se había reducido tras la exposición a la droga.

Tabla 13. Recrudescencia en días, de los parásitos expuestos durante 72 horas a las 4(1H)-piridonas seleccionadas, así como de los cultivos controles. *El día de recrudescencia o aparición, es aquel en el que se observa al menos un 2,5% de parasitemia en el cultivo.

Recrudescencia <i>in vitro</i> (días)*		
	GSK932121A	GW308678X
IC ₅₀ x100	11	7
IC ₅₀ x300	15	14
IC ₅₀ x500	23	17
IC ₅₀ x1000	>28	>28

Controles	% Parasitemia	Día Aparición
10 ⁶ parásitos/cultivo	0,1	4
10 ⁵ parásitos/cultivo	0,01	6
10 ⁴ parásitos/cultivo	0,001	10
10 ³ parásitos/cultivo	0,0001	12-13
10 ² parásitos/cultivo	0,00001	15
10 ¹ parásitos/cultivo	0,000001	20
1 parásito/cultivo	0,0000001	22

Así, para el compuesto GSK932121A, cuando se trató a la concentración equivalente a la IC₅₀x100, el cultivo se redujo de 10⁷ parásitos a 10⁴, ya que los parásitos aparecieron el día 11; los tratados a la IC₅₀x300 se redujeron a 10², los tratados a la IC₅₀X500 se redujeron hasta 1 parásito/cultivo y finalmente los tratados a la IC₅₀x1000 mostraron una cura total. Para el compuesto GW308678X, cuando se trató a la concentración equivalente a la IC₅₀x100, el cultivo se redujo de 10⁷ parásitos a 10⁵, ya que los parásitos aparecieron el día 7; los tratados a la IC₅₀x300 se redujeron a 10², los tratados a la IC₅₀X500 se redujeron hasta 10¹ parásitos/cultivo y finalmente los tratados a la IC₅₀x1000 mostraron una cura total.

Durante el tiempo del ensayo, se evaluó la susceptibilidad de los parásitos que iban apareciendo, por el método estándar de incorporación de [³H]-hipoxantina, para descartar que fueran mutantes resistentes a cada una de las 4(1H)-piridonas frente a las

que fueron ensayados. Ninguno de los parásitos que aparecieron fueron resistentes, mostrando el mismo patrón de sensibilidad que antes del tratamiento de 72 horas, por ejemplo, la IC_{50} de los parásitos que surgieron tras la exposición a la $IC_{50} \times 500$ para el compuesto GSK932121A fue de $0,0022 \pm 0,019 \mu\text{g/mL}$, mientras que para el compuesto GW308678X fue de $0,0033 \pm 0,001 \mu\text{g/mL}$.

DISCUSIÓN

La malaria es la enfermedad parasitaria con mayor impacto mundial desde varios puntos de vista, como son el económico, sociológico y sanitario. Según la *WHO*, son necesarios 5.100 millones de dólares anuales, para alcanzar las metas mundiales establecidas de control y eliminación de la malaria. La enfermedad afecta mayoritariamente a poblaciones pobres y marginadas de países en desarrollo con acceso limitado a servicios eficaces de prevención, diagnóstico y tratamiento. Fueron reportados más de 198 millones de casos en todo el mundo, provocando 584.000 muertes y afectando fundamentalmente a niños menores de 5 años (WHO, 2014). Aunque entre los años 2000 y 2013, la tasa mundial estimada de incidencia de casos de malaria disminuyó en un 30% y en un 47% la mortalidad, siguen siendo millones de personas las que están en riesgo de padecer la enfermedad ya que no tienen el acceso adecuado a las pruebas de diagnóstico, a las mosquiteras tratadas con insecticidas o a los tratamientos de combinación con artemisinina (Greenwood y Mutabingwa, 2002; WHO, 2014).

Un problema añadido es el desarrollo de resistencias por parte de los parásitos, a los antimaláricos comerciales conocidos, así como las resistencias desarrolladas por los mosquitos a los insecticidas empleados para combatirlos, (piretroides fundamentalmente) (WHO, 2014). La resistencia de *P. falciparum* a la artemisinina ha sido detectada recientemente en Camboya, República Democrática Popular Lao, Myanmar, Tailandia y Vietnam, poniendo en peligro el objetivo global de erradicar la malaria (Phyo et al., 2012; Tun et al., 2015).

La Organización de las Naciones Unidas (ONU), ha revisado los objetivos fijados para el milenio (*Millennium Development Goals (MDGs)*), relacionados con malaria (Owens, 2015). Así, para alcanzar el objetivo de reducir en un 10% la incidencia de la malaria en el 2030 (Wells et al., 2015), se deben contemplar nuevas estrategias, de ahí la importancia por ejemplo, de identificar y desarrollar moléculas con nuevos mecanismos de acción que superen las resistencias ya descritas, así como con propiedades específicas ventajosas para la lucha contra la malaria, como ser bloqueantes de la transmisión de la enfermedad, de acción rápida, etc.

5.1. Obtención *in vitro* de formas eritrocíticas de *P. falciparum*

Gracias a Trager y Jensen (1976), las técnicas del cultivo continuo *in vitro* de *P. falciparum* revolucionaron las investigaciones sobre la malaria, siendo la base de

muchos adelantos en bioquímica, parasitología, inmunología y quimioterapia de la malaria (Deharo et al., 2000). Su éxito en el cultivo de los estadios eritrocíticos se basó en el buen conocimiento del ciclo biológico del parásito, en el uso de un medio de cultivo particular (RPMI suplementado con suero humano), en la regeneración del medio de cultivo por cambios frecuentes y en la reducción de la tensión de oxígeno (2-10%) y el incremento del CO₂ (3-5%) (Trager y Jensen, 1976). Desde entonces hasta ahora, más de 3.000 artículos han sido publicados específicamente sobre el cultivo *in vitro* de las formas eritrocíticas de *P. falciparum* (Figura 30).

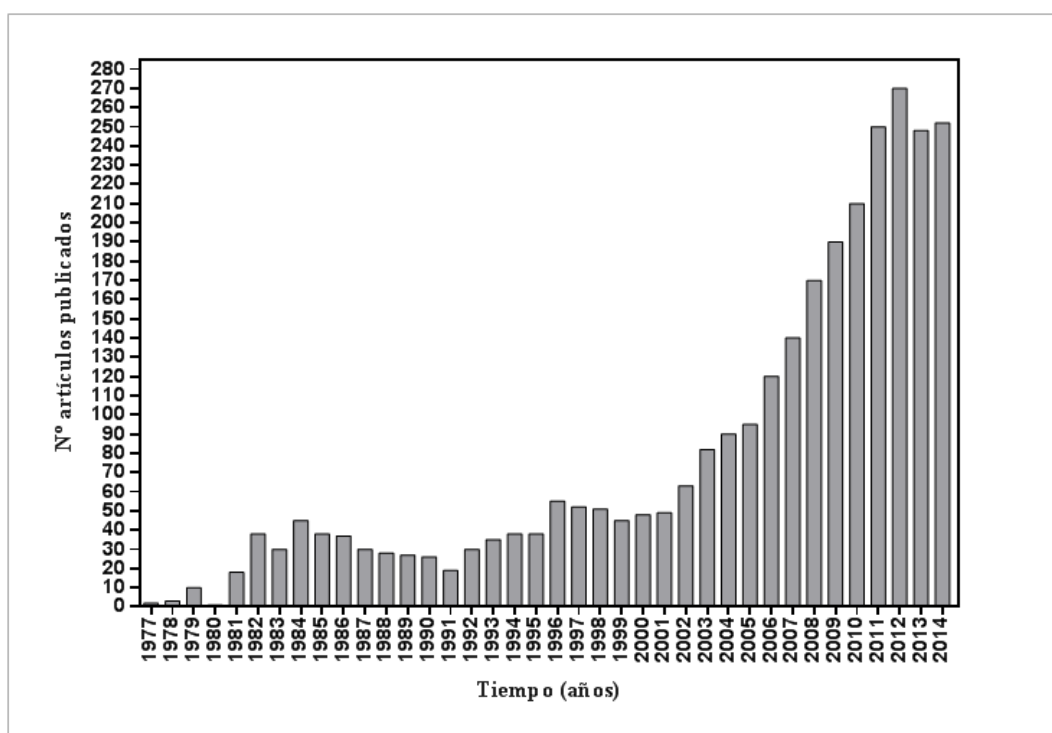


Figura 30. Número de artículos publicados sobre el cultivo *in vitro* de las formas eritrocíticas de *P. falciparum* (Datos obtenidos de *Web of Science*TM).

Uno de los avances más importantes fue el establecer *in vitro* los distintos estadios eritrocíticos de *P. falciparum* de una forma sincrónica, tal y como ocurre durante la infección en el hombre. Para ello han sido descritos varios métodos basados en distintas propiedades, como alternar ciclos de temperatura (Haynes et al., 2002), separación magnética (Ahn et al., 2008), separación física basándose en gradientes de densidad (Aley et al., 1984) o en la lisis por choque osmótico debida a la permeabilidad diferencial que presentan los eritrocitos parasitados por los distintos estadios (Schuster, 2002; Lambros y Vanderberg, 1979). La forma más común y empleada para la sincronización de los estadios eritrocíticos asexuales en los laboratorios, es el

tratamiento con sorbitol o con plasmion para seleccionar las formas jóvenes o maduras, respectivamente (Lambros y Vanderberg, 1979; Ter Kuile et al., 1993; Lelievre et al., 2005). El método del sorbitol, inicialmente descrito por Lambros y Vanderberg (1979) se basa en enriquecer los cultivos en infecciones simples o múltiples de anillos, debido al tratamiento de los cultivos con sorbitol, que provoca la lisis en los eritrocitos infectados con formas maduras, aumentándose esta lisis al aumentar el tiempo de incubación con sorbitol. Además un segundo tratamiento de sorbitol 34 horas después del primero, aumenta el grado de sincronía de los cultivos, ya que en ese momento es cuando se está produciendo la transición entre esquizontes y la formación de nuevos anillos y permite seleccionar específicamente los anillos de nueva formación (Lambros y Vanderberg, 1979). El método del plasmion, se basa en concentrar las formas maduras *knobs*⁺, que expresan *knobs* en la superficie de la membrana de los eritrocitos infectados, según su comportamiento de sedimentación en la solución de plasmion, ya que los trofozoítos viejos y los esquizontes sedimentan más despacio que las formas jóvenes o los eritrocitos no infectados (Lelievre et al., 2005). Ter Kuile combina ambos métodos, realizando un plasmion 6 horas después de un tratamiento con sorbitol (Ter Kuile et al., 1993). Ambos métodos fueron comparados y puestos a punto en el laboratorio, denominándose “Sorbitol 34 horas” y “Sorbitol 6 horas” a los métodos de Lambros y Vanderberg y Ter Kuile respectivamente. Además en ambos se introdujo un tratamiento de sorbitol inicial, de forma que fueran dos sorbitoles secuenciales en 48 horas para así aumentar el grado de sincronía del cultivo. Los resultados obtenidos indicaron que el sorbitol era un método más agresivo que el plasmion ya que se observaron gametocitos en los cultivos donde se realizaban tres tratamientos de sorbitol en menos de dos ciclos de vida completos, afectando por tanto a la viabilidad de los parásitos. La alternancia de forma era la esperada según avanzase el cultivo en el tiempo, siendo determinante la proporción de anillos y la parasitemia inicial que tuviese el cultivo antes de realizar el tratamiento de sorbitol. Así se estableció que para una mayor eficiencia en el protocolo de sincronización por sorbitol, la parasitemia inicial debía de ser como mínimo de un 4% con un 80% de anillos jóvenes, menores de 12 horas, para así garantizar la viabilidad y supervivencia del cultivo. Por su parte, el método de plasmion, al tratarse de un gradiente de sedimentación no afectaba a la viabilidad del parásito y sólo había que considerar que la edad de las formas maduras podía influir en la producción de nuevos anillos, adelantándose ésta en el tiempo si el plasmion se hacía con formas muy maduras, como esquizontes viejos. Además a

medida que la parasitemia fuera aumentando con el tiempo de cultivo, la capacidad de reinvasión del cultivo se podía ver afectada si se llegaba a una parasitemia muy alta, mayor del 5%, en formas maduras mayoritariamente.

Considerando todos estos aspectos estudiados, se estableció un protocolo de sincronización optimizado que permitía tener cultivos altamente sincrónicos durante mucho tiempo, con una única forma predominante en al menos un 90% (Roncalés et al., 2015. Anexo I). Este protocolo combinaba dos tratamientos secuenciales de sorbitol en 48 horas, con un tratamiento de sincronización por plasmion a las 24 horas de cultivo. La parasitemia final se incrementaba en hasta 9 veces, manteniéndose además la sincronía del cultivo. El tiempo de producción de cada estadio eritrocítico asexual específico fue además determinado y establecido a lo largo de las 48 horas del ciclo del parásito, de forma que la obtención de cada estadio era posible facilitando el objetivo final de estudiar en qué estadio actuaba específicamente una determinada droga antimalárica (Figura 31).

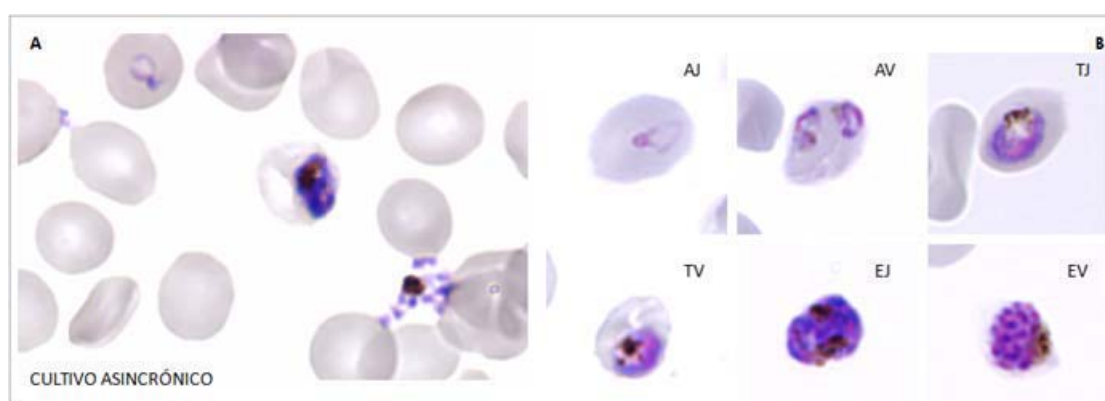


Figura 31. Fotografía al microscopio óptico (por tinción Giemsa) de cultivo asincrónico (A) y sincrónico (B) de *P. falciparum*. Observándose la mezcla de formas en el cultivo asincrónico, de arriba abajo: un anillo joven, un trofozoíto viejo y un esquizonte viejo liberando los merozoítos de su interior (A) y los estadios específicos obtenidos de un cultivo sincrónico con un único estadio mayoritario en al menos un 85-90% (B). (AJ-anillo joven: 0-7h; AV-anillo viejo: 15-22h; TJ-trofozoíto joven: 20-27h; TV-trofozoíto viejo: 25-32h; EJ-esquizonte joven: 30-37h; EV-esquizonte viejo: 40-45h).

Por otro lado, los estadios sexuales de *P. falciparum* constituyen una atractiva diana tanto para vacunas como para el desarrollo de drogas que bloqueen la transmisión, ya que la formación de gametocitos permite al parásito ser transferido al mosquito

cuando éste pica a un ser humano infectado, siendo el estadio implicado en la transmisión de la enfermedad (Bennett et al., 2005; Talman et al., 2004). Es por tanto el gametocito, una forma especializada capaz de ajustarse a vivir en condiciones y ambientes muy distintos, en el hombre y en el mosquito, produciéndose para ello muchos cambios a nivel biológico, metabólico, de expresión génica y de síntesis de proteínas entre otros (Talman et al., 2004; Dyer y Day, 2000; Sinden, 2009). Las dificultades en cuanto al cultivo *in vitro* y a la obtención de grandes cantidades de gametocitos en el laboratorio, han limitado el progreso de la investigación de estos estadios, particularmente el de los gametocitos jóvenes (Fivelman et al., 2007; Bennett et al., 2005). Si bien aunque no todos los factores potenciadores de la gametocitogénesis o formación de gametocitos están identificados, existen evidencias que relacionan una reducción en la parasitemia en formas asexuales con un incremento en la producción de gametocitos (Dyer y Day, 2000). Además hay diversas teorías descritas sobre qué forma del ciclo asexual, debido a la influencia de factores ambientales, es la que está determinada para desarrollarse a gametocitos. Según Carter y Miller puede ser un anillo o merozoíto el que se diferencie en formas asexuales o en gametocitos (modelo I), o puede ser que la forma asexual se comprometa a desarrollarse a gametocitos, pero que no se manifieste hasta la siguiente generación de parásitos, donde todas las formas serán o asexuales o gametocitos (modelo II), o sólo algunos merozoítos de la generación siguiente producirán gametocitos (modelo III) (Carter y Miller, 1979). Sin conocerse hasta el momento todos estos detalles, sí se puede concluir que para que se produzcan los gametocitos, tiene que haber por un lado, un proceso inductivo que comprometa a ciertas formas asexuales en formas productoras de gametocitos y por otro, un proceso de desarrollo que garantice por completo la diferenciación de los gametocitos (Ifediba y Vanderberg, 1981) (Figura 32A).

Aunque los gametocitos fueron descritos por primera vez en 1880 (Laveran, 1880) los mecanismos moleculares implicados en su formación no habían conseguido ser identificados, considerándose el “santo grial” de la biología del parásito (Baker, 2010; Kafsack et al., 2014). Dado que los factores ambientales influyen en el desarrollo de los gametocitos, la existencia de mecanismos de señalización controlados por factores de transcripción, entre los parásitos y el ambiente era un hecho constatable, destacando sobre todo el papel del *cAMP* (*cyclic adenosine monophosphate*) y de las proteínas quinasas (Figura 32B). Estudios recientes determinan que la proteína de unión al ADN: *PfAP2-G* (del inglés, *DNA-binding protein PfAP2-G*) es esencial para la

diferenciación sexual del parásito, identificándose por primera vez, una proteína reguladora del cambio transcripcional que se da en la diferenciación de los estadios sexuales del parásito (Kafsack et al., 2014).

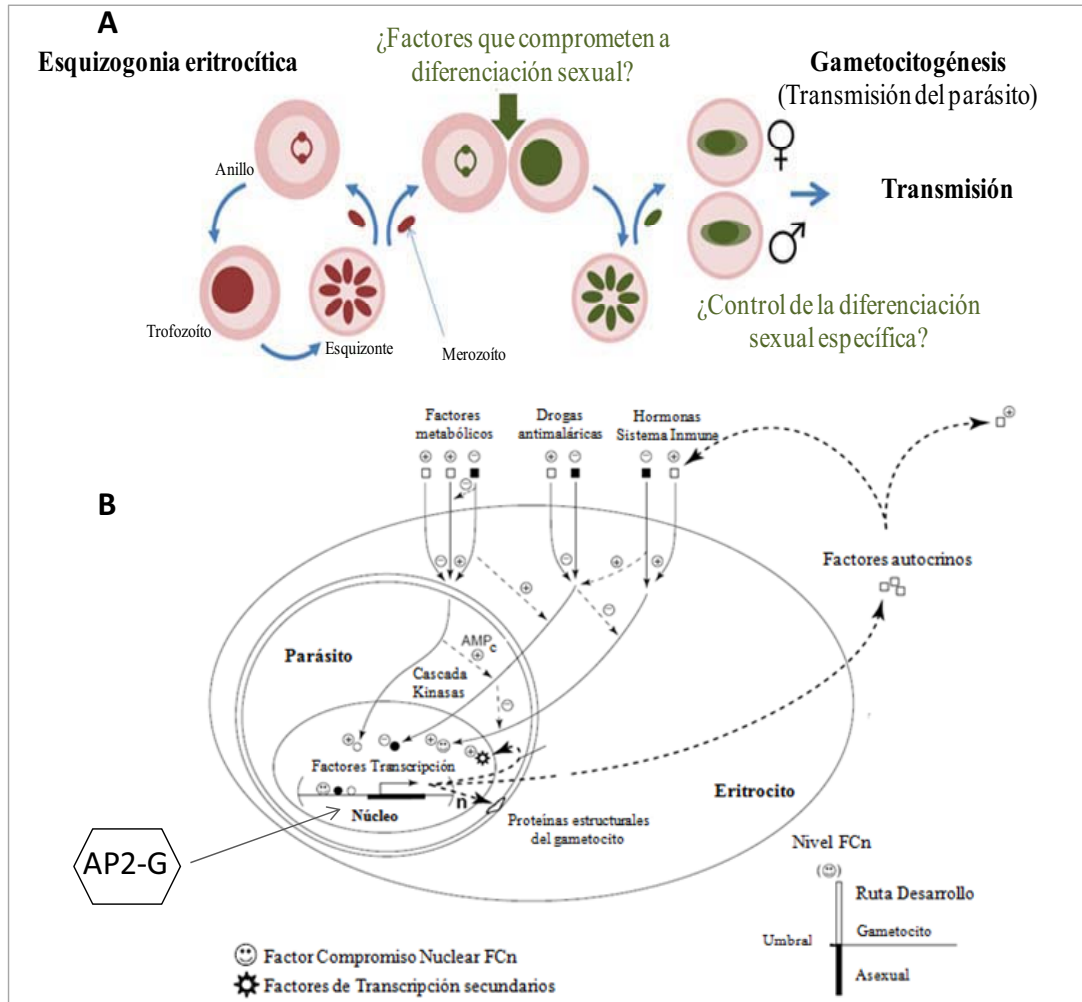


Figura 32. Esquema general de los posibles factores inductores de la gametocitogénesis (A). Modelo cuantitativo del compromiso de gametocitogénesis modificado de Dyer y Day, 2000. (B). Donde los factores potenciadores están representados por □ y los factores inhibidores por ■ (AMP_c: monofosfato de adenosina cíclico, AP2-G: Proteína 2 de unión al ADN).

Dada la complejidad del proceso y debido a que no es aún conocido el factor ambiental responsable, se estudiaron diversos factores como posibles desencadenantes de la gametocitogénesis. Comprobándose que la obtención *in vitro* de gametocitos de *P. falciparum* es una tarea laboriosa y complicada, ya que por ejemplo, no todas las cepas producen gametocitos *in vitro* incluso siendo inducidas de la misma manera y la producción requiere como mínimo de 15 días de cultivo en unas condiciones específicas

(Bennett et al., 2005). Si bien, si parece que el compromiso de desarrollarse a estadios sexuales, lo adquiere el parásito como respuesta al estrés que las condiciones desfavorables de su entorno le provocan (Baker, 2010). Simular esas condiciones desfavorables se consigue *in vitro* de varias maneras: produciendo una alta parasitemia en formas asexuales (Baker, 2010), reduciendo el hematocrito del cultivo (Akompong et al., 2000; Ifediba y Vanderberg, 1981), añadiendo eritrocitos lisados al cultivo (*LUE*) (Schneweis et al., 1991), añadiendo eritrocitos con el contenido de hemoglobina reducido (Bennett et al., 2005), eliminando las formas asexuales, etc. (Chavalitsheewinkoon-Petmitr et al., 2001; Chutmongkonkul et al., 1992).

Los factores desencadenantes de la gametocitogénesis que permitieron una mayor producción y maduración de gametocitos fueron, la reducción del número de estadios asexuales por pulsos de sorbitol combinado con la adición de eritrocitos lisados (*LUE*), siendo la cepa NF54 la mayor productora de gametocitos, aumentándose dicha producción si la cepa estaba recién descongelada y sincrónica por dos tratamientos secuenciales de sorbitol (Roncalés et al., 2012; Anexo II). De esta manera quedó establecido el protocolo de producción de gametocitos como ilustra la Figura 33.

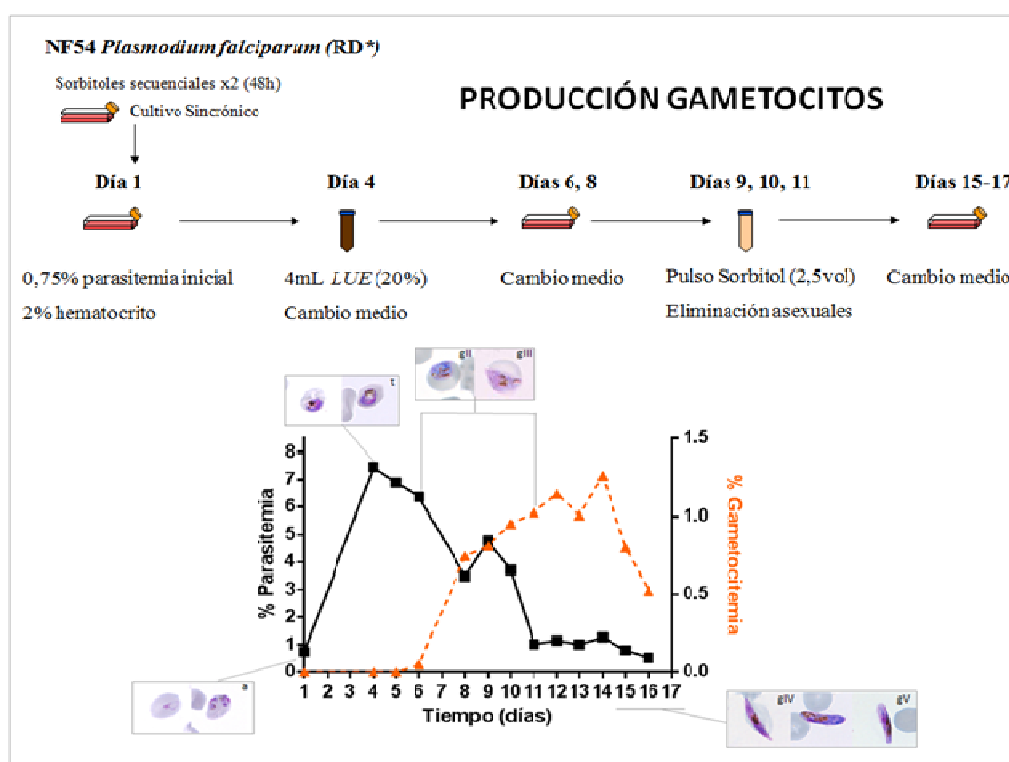


Figura 33. Método optimizado de producción *in vitro* de gametocitos de *P. falciparum* (RD*: recién descongelada; a: anillos; t: trofozoítos; gII: estadio II de gametocitos; gIII: estadio III; gIV: estadio IV; gV: estadio V; Se representa la media de n=3 ensayos, donde el valor de la desviación estándar fue menor del 5%).

El establecimiento de este protocolo fue el punto de partida de la generación de gametocitos de *P. falciparum* en el laboratorio, muy importantes tanto para el estudio de la posible actividad gametocitocida de los compuestos como para el desarrollo de los siguientes estadios (gametos) implicados en el complejo ciclo de vida del parásito.

5.2. Estudio de la actividad antimalárica de la serie química 4(1H)-piridonas

El desarrollo y lanzamiento de un nuevo fármaco es un proceso largo y riguroso que puede llevar más de 15 años, desde que se progresa una idea o investigación en el laboratorio hasta que el nuevo fármaco recibe todas las autorizaciones necesarias para ser aprobado y regulado. De media se investigan unas 5.000 moléculas químicas diferentes hasta que se consigue identificar una que pueda ser ensayada en humanos. En la Figura 34 se representan las seis fases que contempla la farmacéutica GlaxoSmithKline (GSK) para el desarrollo de un fármaco. Las moléculas pertenecientes al proyecto 4(1H)-piridonas se estudiaron desde que se identificó un *hit* (compuesto activo para una diana propuesta), posteriormente se optimizaron hasta declarar una molécula *lead* (compuesto cabeza de serie) y finalmente el compuesto *lead* se mejoró hasta declarar un compuesto candidato preclínico.

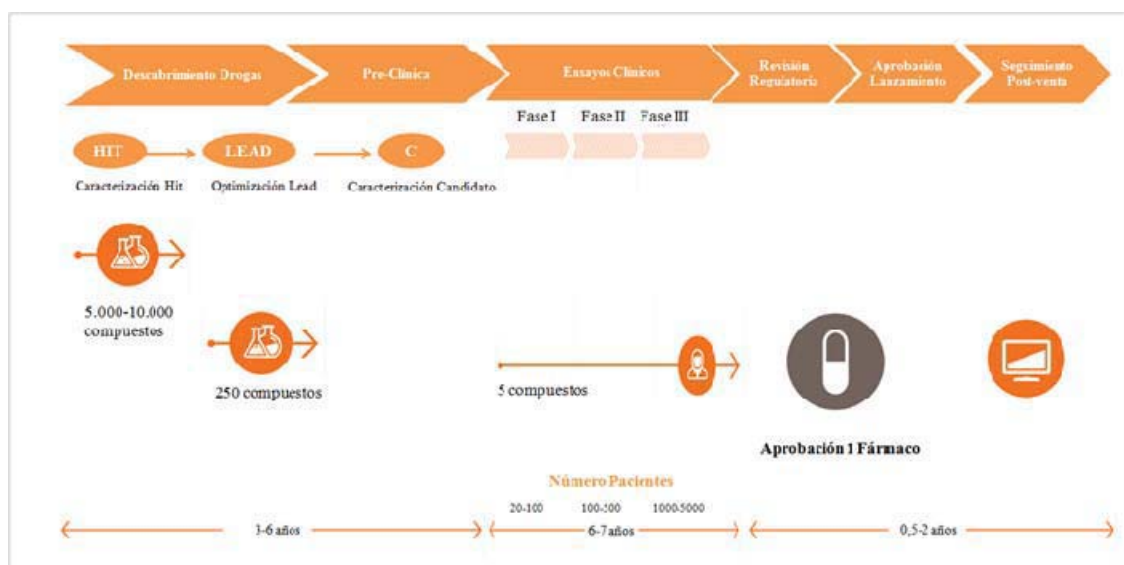


Figura 34. Diagrama de las fases de desarrollo de un nuevo fármaco (C: candidato; Fuente: GSK).

La atovaquona, 2-[trans-4-(4'-clorofenil)ciclohexil]-3-hidroxi-1,4-naftoquinona, es una hidroxinaftoquinona desarrollada en las últimas décadas como antimalárico

debido a su conocida actividad a nivel mitocondrial (Srivastava y Vaidya, 1999). La atovaquona inhibe selectivamente el transporte electrónico mitocondrial del parásito, inhibiendo el complejo *bc1* y colapsando el potencial de membrana mitocondrial a concentraciones nanomolares (Mather et al., 2005). Por tanto, el citocromo *bc1* (complejo III; ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa) es una diana validada para el tratamiento y prevención de la malaria (Capper et al., 2015). Se trata de una proteína del transporte mitocondrial (multisubunidad dimérica) localizada en la parte interna de la membrana mitocondrial (Berry et al., 2011; Iwata et al., 1998). Tiene tres subunidades catalíticas: citocromo b, citocromo c1, y la proteína *Rieske* (hierro-azufre), presentes en todos los complejos *bc1*. El complejo forma parte de la cadena respiratoria (Figura 35), donde actúa transportando protones al interior del espacio intermembrana a través de la oxidación y reducción de la ubiquinona. Para ello se requieren dos sitios de unión para la oxidación y reducción del ubiquinol y la ubiquinona respectivamente, localizados en el citocromo b. El sitio de unión Qo actúa oxidando el ubiquinol cerca del espacio intermembrana, mientras que el sitio de unión Qi reduce la ubiquinona cerca de la matriz mitocondrial (Berry et al., 2011; Mather et al., 2005).

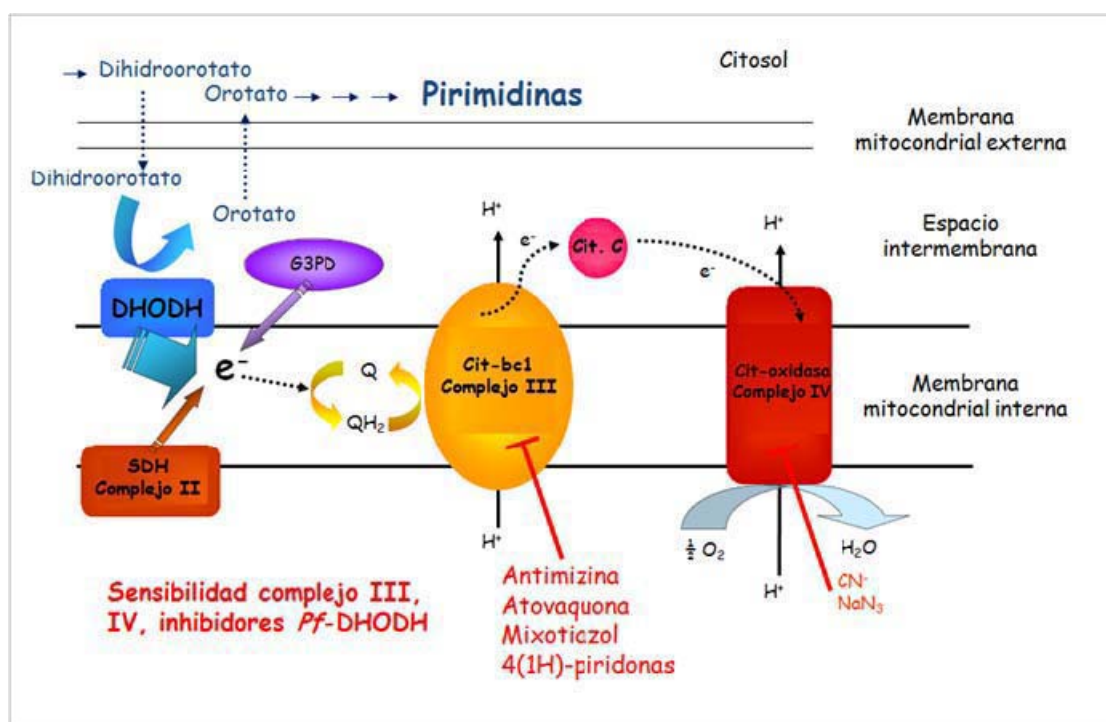


Figura 35. Cadena electrónica del transporte mitocondrial de *P. falciparum*. (DHODH: Dihidro-orotato deshidrogenasa; G3PD: Glicerol-3P-deshidrogenasa; SDH: Succinato deshidrogenasa (Complejo II); Q: Ubiquinona; QH₂: Ubihiidroquinona; Cit.: citocromo).

En *P. falciparum*, el citocromo *bc1* es esencial para asegurar suficiente cantidad de ubiquinol oxidado, para que la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) lo pueda usar en la síntesis de pirimidinas. La inhibición del citocromo *bc1* o de la enzima DHODH provoca la muerte del parásito (Srivastava y Vaidya, 1999).

El empleo de ensayos de mutagénesis dirigida del citocromo b bacteriano, combinados con medidas bioquímicas y fisiológicas, ha permitido identificar el mecanismo de acción específico de la atovaquona. Se sabe que es necesario un movimiento del dominio que envuelve a la proteína *Rieske*, para que se produzca la transferencia de electrones de la ubihidroquinona unida al complejo b, al complejo c1 del complejo citocromo *bc1*. La atovaquona bloquea el movimiento de este dominio, cerrando la subunidad de la proteína *Rieske*, en la conformación de unión al citocromo b, en concreto actuando a nivel de la subunidad Qo (Mather et al., 2005).

Dado que la cadena de transporte electrónica mitocondrial ha sido validada como diana para drogas antimaláricas, el desarrollo de nuevos inhibidores basados en la interacciones diferentes, a la de la atovaquona con el complejo *bc1*, aportarían nuevos compuestos con actividad antimalárica, especialmente para combatir las resistencias generadas a la atovaquona.

Por este motivo, en GSK se desarrolló el programa de química médica basado en las 4(1H)-piridonas, a partir de una molécula conocida como clopidol (Bueno et al., 2012). El clopidol se trata de una droga anticoccídica, antagonista del ubiquinol con actividad antimalárica, incluso en cepas resistentes a cloroquina y cuyo mecanismo de acción es también conocido, actuando al igual que la atovaquona, inhibiendo la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Bueno et al., 2012). Con el objetivo de aumentar la potencia del clopidol, fueron empleadas diversas estrategias químicas basándose en el uso del núcleo de 4(1H)-piridonas (Figura 36), y reemplazando uno de los átomos de cloro presentes en el carbono 5 del clopidol (C-5), por la introducción de una cadena lipofílica en dicho carbono C-5. Con esta estrategia se obtuvieron compuestos potentes pero muy lipofílicos y con una vida media muy larga, lo que suponía un problema para continuar con su desarrollo, porque ocasionaban acumulo del compuesto en los tejidos (Bueno et al., 2012). Para solucionar este problema, se diseñaron compuestos menos lipofílicos y con una mayor solubilidad y menor vida media, introduciendo para ello grupos polares en la cadena lipofílica. Algunas de estas modificaciones provocaron la pérdida de potencia de los compuestos por lo que se rediseño la estrategia química

centrándose en producir cambios en el propio núcleo de las 4(1H)-piridonas. Así se probaron diversas modificaciones como por ejemplo introducir un grupo polar en la posición C-3 o introducir aminas terciarias y grupos carboxilos en las posiciones C-2 y C-6 del anillo de piridonas respectivamente, todas estas modificaciones provocaban la pérdida total de actividad. Si bien, la introducción del grupo polar CH₂OH en el C-2 o en el C-6 (compuesto GSK932121A) mantenía la potencia antimalárica, por lo que se continuó con esta estrategia química, caracterizando su perfil antimalárico.

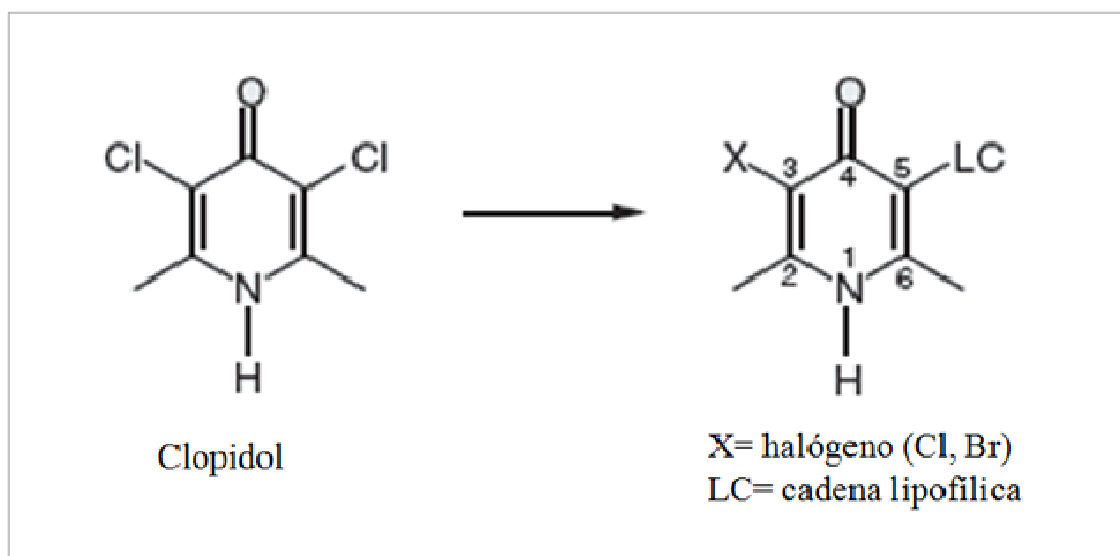


Figura 36. Estructura química del clopidol y de las 4(1H)-piridonas.

En total se sintetizaron más de 800 derivados de las 4(1H)-piridonas, seleccionándose los compuestos GSK932121A, GW844520, GW308678X, GSK678137A y GSK375074A para su completo estudio biológico. En primer lugar se estudio su mecanismo de acción para comprobar que actuaban inhibiendo la cadena de transporte electrónico mitocondrial del parásito. Por un lado, se determinó la selectividad de la diana *bc1*, estudiando la inhibición de los compuestos seleccionados en la actividad de la enzima ubiquinol citocromo c reductasa (Complejo III) en mitocondrias aisladas de *P. falciparum* y en mitocondrias aisladas de líneas humanas HEK293, resultando ser inhibidores selectivos del complejo III, aunque menos potentes que la atovaquona (ver Tabla 7, apartado de resultados). Posteriormente, se comprobó su actividad en el resto de complejos (II, IV) usando como sustratos específicos de los mismos, succinato o citocromo oxidasa respectivamente, resultando ser inactivos frente al resto de enzimas respiratorias y observándose una potencia 100 veces menor para el complejo III en células de mamífero y levaduras (*S. cerevisiae*), demostrando por tanto

su selectividad frente al complejo *bc1* (complejo III) de *P. falciparum*, al igual que ocurre con la atovaquona (Gamo et al., 2005).

Con el objetivo de caracterizar genéticamente la diana de las 4(1H)-piridonas, se obtuvieron mutantes, con una sensibilidad reducida a dos piridonas seleccionadas, estos parásitos fueron seleccionados y el gen del citocromo b fue amplificado y secuenciado (Gamo et al., 2005). Los parásitos resistentes obtenidos *in vitro*, presentaron una mutación puntual tipo V284L donde se sustituye una valina por una leucina o la mutación G131S, que sustituye glicina por serina. Las posiciones equivalentes en el citocromo b de levaduras, a las mutaciones obtenidas V284L y G131S, corresponden al dominio de unión de la atovaquona y del inhibidor mitocondrial estigmatelina (Mather et al., 2005). Los mutantes obtenidos no mostraron resistencia cruzada frente a los antimaláricos comerciales, cloroquina, artemisinina, atovaquona y pirimetamina (Gamo et al., 2005). Las mutaciones puntuales del citocromo b de *P. falciparum* confieren una marcada reducción en la susceptibilidad a atovaquona, siendo la generación de parásitos resistentes a atovaquona fácil de inducir experimentalmente (White, 1998; Barnes et al., 2005). Por este motivo, se estudió la frecuencia espontánea de aparición de mutantes resistentes a las 4(1H)-piridonas, no obteniéndose ningún mutante en inóculos de hasta 10^8 parásitos. En tanto que para la atovaquona, si se obtuvieron mutantes, siendo por tanto este hecho, una ventaja de esta familia frente a otros inhibidores de *bc1*.

Considerando todos estos resultados, se confirmaba que el citocromo *bc1* era la diana de las 4(1H)-piridonas. Si bien no ha sido hasta recientemente (Capper et al., 2015) cuando se ha identificado por cristalografía de rayos-X y modelos *in silico*, que las 4(1H)-piridonas se unen al sitio de unión Qi, mientras que la atovaquona se une al sitio de unión Qo del citocromo *bc1* (Figura 37), explicando posiblemente esta diferencia de unión, la potencia observada en la actividad de las 4(1H)-piridonas en cepas resistentes a la atovaquona (FCR3-A).

Esta diferencia en cuanto al sitio de unión al ubiquinol entre la atovaquona y las 4(1H)-piridonas también podría explicar el efecto observado en los ensayos de combinaciones, donde así como la combinación atovaquona-proguanil es claramente sinérgica, la combinación de las 4(1H)-piridonas con el proguanil no resultó sinérgica, siendo indiferente o aditiva según el derivado ensayado.

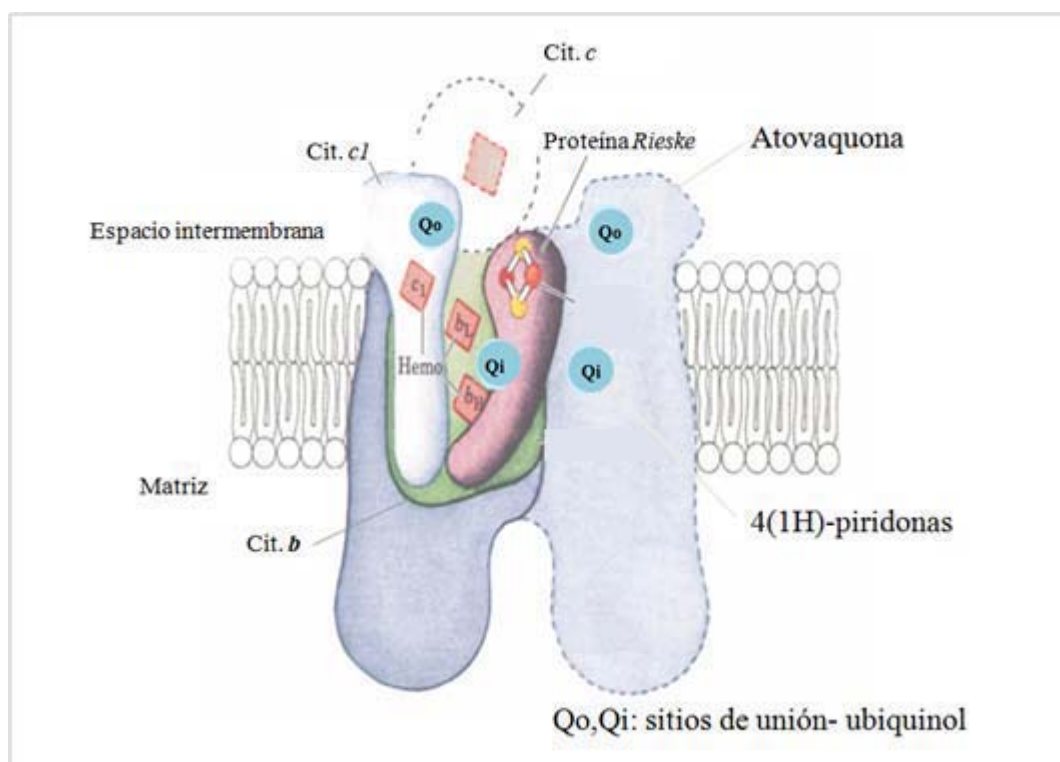


Figura 37. Esquema del citocromo *bc1* con los sitios de unión al ubiquinol (Qo, Qi). (Modificado de Lehninger. *Principles of Biochemistry*. Cit.: citocromo).

En la combinación atovaquona-proguanil, es la atovaquona por sí sola la responsable de colapsar el potencial de membrana a concentraciones submicromolares e inhibir la respiración del parásito; mientras que el proguanil no provoca ninguno de esos efectos por sí mismo, salvo si el tratamiento es en combinación, donde el proguanil potencia el colapso del potencial de membrana provocado por la atovaquona (Srivastava y Vaidya, 1999). El hecho de que las 4(1H)-piridonas no mostrasen efecto sinérgico al ser combinadas con el proguanil, apoyaba a su vez, el mecanismo de inhibición diferente de las 4(1H)-piridonas al descrito para la atovaquona.

Estas diferencias con respecto a la atovaquona, hicieron pensar que las 4(1H)-piridonas serían una familia interesante para su posterior estudio, con potencial actividad frente a mutantes resistentes a atovaquona. Así, se caracterizaron las propiedades biológicas de las 4(1H)-piridonas, siendo extremadamente potentes *in vitro* frente a parásitos de *P. falciparum*, incluso en cepas resistentes a cloroquina, a atovaquona y a cloroquina-pirimetamina; mostrando además selectividad específica por el complejo *bc1* de *P. falciparum*, en concreto a nivel de la subunidad de unión Qi.

Sin embargo aunque los datos de citotoxicidad indicaron una ventana de selectividad de 2 a 3 órdenes de magnitud cuando se comparaban con células humanas, es importante resaltar la baja solubilidad de las 4(1H)-piridonas que impidió calcular el índice de selectividad exacto.

Por lo general, los estudios de nuevos antimaláricos no se han basado en determinar la actividad *in vitro* específica de cada estadio eritrocítico (Chimanuka et al., 2001; Contreras et al., 2004). Sin embargo, dado que en los pacientes infectados con malaria, las formas jóvenes o anillos son las únicas circulantes en sangre, mientras que las formas maduras quedan adheridas al endotelio vascular, afectando a distintos órganos (Miller et al., 2002), es importante determinar sobre qué forma en concreto actúa un posible antimalárico. Uno ideal sería aquel que matase de forma rápida a los parásitos, actuando sobre todas las formas por igual, tanto jóvenes como maduras, produciendo un alivio rápido de los síntomas y favoreciendo a su vez la reducción en la aparición de resistencias, ya que se disminuiría rápidamente la carga parasitaria. Este estudio sobre la actividad específica de cada estadio eritrocítico sí se realizó en el caso de las 4(1H)-piridonas, obteniéndose como resultado que actuaban más específicamente sobre las formas maduras, especialmente trofozoítos viejos y esquizontes jóvenes.

Si tenemos en cuenta a su vez los resultados obtenidos en el ensayo de velocidad de acción, donde se mide la inhibición de incorporación de [³H]-hipoxantina. Las 4(1H)-piridonas no resultaron ni tan rápidas como la cloroquina y la artemisinina (que actúan sobre todas las formas pero predominantemente sobre anillos), ni tan lentas como la mefloquina y atovaquona y considerando la hipótesis de Le Manach, donde se relaciona un comportamiento lento, como el de la atovaquona, con una actividad específica exclusiva de formas maduras (esquizontes) y un comportamiento rápido, como el de la cloroquina y artemisinina, con una actividad específica tanto en anillos como en esquizontes (LeManach et al., 2013), podríamos concluir que efectivamente las 4(1H)-piridonas por su actividad específica de formas maduras y no así en anillos, se comportarían más bien de una forma lenta, aunque no tanto como la atovaquona.

Los datos obtenidos en el ensayo de velocidad de acción se vieron corroborados por un ensayo que posteriormente se puso a punto en el centro. Dicho ensayo mide directamente el efecto de los compuestos en la viabilidad de los parásitos asexuales intraeritrocíticos, definiendo el ratio de reducción (*killing rate*) y el tiempo de

aclaramiento (*clearance time*) de los parásitos, siendo éstos dos parámetros típicos para definir y relacionar los mecanismos de acción de los compuestos (Sanz et al., 2012).

Así mismo, las 4(1H)-piridonas no resultaron ser activas en gametocitos jóvenes ni en gametocitos maduros (ensayo este último realizado por el método de *ATP* descrito por Lelievre (Lelievre et al., 2012), no actuando por tanto como bloqueantes de la transmisión. Corroborando lo descrito por Fleck para otro inhibidor mitocondrial como es la atovaquona, que fue descrita como inactiva frente a gametocitos jóvenes y maduros (Fleck et al., 1996).

Un dato a destacar de esta familia fue su capaz para erradicar los parásitos tras 3 días de incubación. A una concentración equivalente a la ($IC_{50} \times 1000$), los productos GSK932121A y GW308678X redujeron la parasitemia 6 órdenes de magnitud tras 3 días de exposición, no apareciendo parásitos tras 28 días en cultivo. Los datos obtenidos en el ensayo de recrudescencia fueron similares a los obtenidos por el método descrito por Sanz (Sanz et al., 2012). Esta característica junto con la alta potencia frente a cepas resistentes a antimaláricos comerciales, favoreció que ambos productos se progresasen como candidatos preclínicos.

En la industria farmacéutica, se inician programas químicos (*back-up*) con el fin de mejorar las características de las moléculas en desarrollo. En el caso de las 4(1H)-piridonas se intentó incrementar su baja solubilidad, usando para ello pro-drogas solubles en agua que no perdiesen su actividad *in vitro* (Bueno et al., 2012). Así, la solubilidad se vio aumentada con el uso como pro-drogas, de ésteres de fosfato solubles en agua en el carbono 6 de las 4(1H)-piridonas. Sin embargo cuando la pro-droga fue administrada en ratas se observaron signos de toxicidad. Debido a los resultados observados con la pro-droga más soluble, pero con toxicidad asociada en ratas, la progresión de esta familia fue cancelada.

Queda por tanto patente, la complejidad del desarrollo de un fármaco, en este caso de un antimalárico, donde confluyen infinidad de factores, tanto del parásito como de las propias moléculas sintetizadas, que hacen del estudio y diseño de nuevos antimaláricos una apasionante historia. El descubrimiento reciente del sitio de unión específico de las 4(1H)-piridonas a la subunidad Qi del citocromo *bc1*, plantea la idea de nuevas estrategias para desarrollar inhibidores específicos de la diana de las 4(1H)-piridonas pero sin los problemas de solubilidad y toxicidad asociados a esta familia.

CONCLUSIONES

1. Se ha optimizado el método de sincronización de las formas eritrocíticas asexuales de *P. falciparum*, consiguiéndose un cultivo *in vitro* altamente sincrónico en el tiempo, en unas condiciones óptimas para el crecimiento del parásito. Dicho método combina dos tratamientos secuenciales de sorbitol en 48 horas, con un tratamiento de sincronización por plasmion a las 24 horas de cultivo. El tiempo de producción de cada estadio eritrocítico asexual específico del ciclo del parásito, quedo a su vez definido, de forma que los anillos jóvenes se obtienen entre las 0-7 horas del cultivo, los anillos viejos entre las 15-22 horas, los trofozoítos jóvenes entre las 20-27 horas, los trofozoítos viejos entre las 25-32 horas, los esquizontes jóvenes entre las 30-37 horas y los esquizontes viejos entre las 40-45 horas.

2. Se ha establecido un método de producción de gametocitos o formas sexuales de *P. falciparum*, donde la adición de eritrocitos lisados en combinación con la reducción del número de estadios asexuales, constituyen los factores potenciadores de la gametocitogénesis. Este método optimizado permite obtener *in vitro*, los distintos estadios de gametocitos completándose además su total maduración (estadio II a día 6 de producción, estadio III a día 11, estadio IV a día 14 y estadio V a día 16).

3. El estudio de la actividad antimalárica de las 4(1H)-piridonas permitió caracterizar *in vitro* a esta familia como inhibidores selectivos del complejo *bc1* (complejo III o complejo ubiquinol citocromo c reductasa) del parásito, con un mecanismo de inhibición diferente al de la atovaquona, corroborado por el ensayo de combinaciones, donde no se obtuvo efecto sinérgico de las 4(1H)-piridonas con el proguanil, a diferencia de lo que si ocurre con la atovaquona. La actividad sobre las formas eritrocíticas del parásito fue también valorada, obteniéndose un efecto específico sobre las formas asexuales maduras (trofozoítos viejos y esquizontes jóvenes). Sin embargo estos compuestos no resultaron ser activos sobre las formas sexuales o gametocitos. Su velocidad de acción fue más lenta que la observada con cloroquina o artemisinina, pero presentaron la gran ventaja de tener una frecuencia de aparición de resistentes baja y de ser capaces de erradicar parásitos tras tres días de incubación, a la mayor concentración testada ($IC_{50 \times 1000}$), además de su extremada potencia *in vitro* frente a parásitos de *P. falciparum*, incluso en cepas resistentes a cloroquina, atovaquona y cloroquina-pirimetamina.

BIBLIOGRAFÍA

- Achidi, E. A.; Agbenyega, T.; Allen, S.; Amodu, O.; Bojang, K.; Conway, D.; Corran, P.; Deloukas, P.; Djimde, A.; Dolo, A. A global network for investigating the genomic epidemiology of malaria. *Nature* **2008**, *456*, 732-737.
- Ahn, S.; Shin, M.; Kim, Y.; Yoo, J.; Kwak, D.; Jung, Y.; Jun, G.; Ryu, S.; Yeom, J.; Ahn, J. Magnetic separation: a highly effective method for synchronization of cultured erythrocytic *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* **2008**, *102*, 1195-1200.
- Aikawa, M. Human cerebral malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1988**, *39*, 3-10.
- Akompong, T.; Eksi, S.; Williamson, K.; Haldar, K. Gametocytocidal activity and synergistic interactions of riboflavin with standard antimalarial drugs against growth of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 3107-3111.
- Aley, S. B.; Sherwood, J. A.; Howard, R. J. Knob-positive and knob-negative *Plasmodium falciparum* differ in expression of a strain-specific malarial antigen on the surface of infected erythrocytes. *J. Exp. Med.* **1984**, *160*, 1585-1590.
- Almela, M. J.; Torres, P. A.; Lozano, S.; Herreros, E. Characterization of the phospholipidogenic potential of 4 (1H)-pyridone antimalarial derivatives. *Toxicology in vitro* **2009**, *23*, 1528-1534.
- Alonso, P. L.; Brown, G.; Arevalo-Herrera, M.; Binka, F.; Chitnis, C.; Collins, F.; Doumbo, O. K.; Greenwood, B.; Hall, B. F.; Levine, M. M. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med* **2011**, *8*, e1000406.
- Armstrong Schellenberg, J.; Mukasa, O.; Abdulla, S.; Marchant, T.; Lengeler, C.; Kikumbih, N.; Mshinda, H.; Nathan, R. The Ifakara demographic surveillance system. *INDEPTH Monograph Series: Demographic surveillance systems for assessing populations and their health in developing countries* **2001**, *1*, 159-164.
- Baker, D. A. Malaria gametocytogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2010**, *172*, 57-65.
- Bannister, L.; Hopkins, J.; Fowler, R.; Krishna, S.; Mitchell, G. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology Today* **2000**, *16*, 427-433.
- Barnes, K.; Durrheim, D.; Little, F.; Jackson, A.; Mehta, U.; Allen, E.; Dlamini, S.; Tsoka, J.; Bredenkarp, B.; Mthembu, J.; White, N.; Sharp, B. Effect of artemether-lumefantrine policy and improved vector control on malaria burden in KwaZulu-Natal, South Africa. *PloS Med* **2005**, e330.
- Baruch, D. I.; Pasloske, B. L.; Singh, H. B.; Bi, X.; Ma, X. C.; Feldman, M.; Taraschi, T. F.; Howard, R. J. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* **1995**, *82*, 77-87.
- Beeson, J. G.; Brown, G. V.; Molyneux, M. E.; Mhango, C.; Dzinjalama, F.; Rogerson, S. J. *Plasmodium falciparum* isolates from infected pregnant women and children are associated with distinct adhesive and antigenic properties. *J. Infect. Dis.* **1999**, *180*, 464-472.

- Bennett, T. N.; Kosar, A. D.; Roepe, P. D. *Plasmodium falciparum* strain GC-03 exhibits hyper-gametocytogenesis in partially hemoglobin depleted red blood cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2005**, *139*, 261-265.
- Berry, E. A.; Huang, L. Conformationally linked interaction in the cytochrome bc 1 complex between inhibitors of the Q o site and the Rieske iron-sulfur protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* **2011**, *1807*, 1349-1363.
- Biamonte, M. A.; Wanner, J.; Le Roch, K. G. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2829-2843.
- Biggs, B. A.; Gooze, L.; Wycherley, K.; Wollish, W.; Southwell, B.; Leech, J. H.; Brown, G. V. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 9171-9174.
- Biggs, B.; Brown, G. Malaria. *Principles and Practise of Clinical Parasitology* **2001**, 53-98.
- Bloland, P. B.; Ettling, M.; Meek, S. Combination therapy for malaria in Africa: hype or hope? *Bull. World Health Organ.* **2000**, *78*, 1378-1388.
- Bolchoz, L. J.; Budinsky, R. A.; McMillan, D. C.; Jollow, D. J. Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *297*, 509-515.
- Bosman, A.; Mendis, K. N. A major transition in malaria treatment: the adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 193-197.
- Boyd, M. F. *Malariology: A comprehensive survey of all aspects of this group of diseases from a global standpoint*; Saunders: 1949; Vol. 2.
- Brockman, A.; Price, R. N.; van Vugt, M.; Heppner, D. G.; Walsh, D.; Sookto, P.; Wimonwattawatee, T.; Looareesuwan, S.; White, N. J.; Nosten, F. *Plasmodium falciparum* antimalarial drug susceptibility on the north-western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *94*, 537-544.
- Bruce-Chwatt, L. J.; Wernsdorfer, W.; McGregor, I. History of malaria from prehistory to eradication. *Malaria: principles and practice of malariology. Volume 1.* **1988**, 1-59.
- Bueno, J. M.; Herreros, E.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer, S.; Fiandor, J. M.; Gamo, F. J.; Gargallo-Viola, D.; Derimanov, G. Exploration of 4 (1H)-pyridones as a novel family of potent antimalarial inhibitors of the plasmodial cytochrome bc1. *Future medicinal chemistry* **2012**, *4*, 2311-2323.
- Bwijo, B.; Hassan Alin, M.; Abbas, N.; Eriksson, Ö.; Björkman, A. Repetitive dosing of artemisinin and quinine against *Plasmodium falciparum* *in vitro*: a simulation of the *in vivo* pharmacokinetics. *Acta Trop.* **1997**, *65*, 11-22.

- Canfield, C.; Pudney, M.; Gutteridge, W. Interactions of atovaquone with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **1995**, *80*, 373-381.
- Capper, M. J.; O'Neill, P. M.; Fisher, N.; Strange, R. W.; Moss, D.; Ward, S. A.; Berry, N. G.; Lawrenson, A. S.; Hasnain, S. S.; Biagini, G. A.; Antonyuk, S. V. Antimalarial 4(1H)-pyridones bind to the Qi site of cytochrome bc1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 755-760.
- Carter, R.; Miller, L. H. Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum* in continuous culture. *Bull. WHO* **1979**, *57*, 37-52.
- Chavalitsheewinkoon-Petmitr, P.; Pongvilairat, G.; Ralph, R.; Denny, W.; Wilairat, P. Inhibitory effects of 9-anilinoacridines on *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Tropical Medicine & International Health* **2001**, *6*, 42-45.
- Chen, Q.; Schlichtherle, M.; Wahlgren, M. Molecular aspects of severe malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13*, 439-450.
- Chimanuka, B.; Francois, G.; Timperman, G.; Heyden, V. Y.; Holenz, J.; Plaizier-Vercammen, J.; Bringmann, G. A comparison of the stage-specific efficacy of chloroquine, artemether and dioncophylline B against the rodent malaria parasite *Plasmodium chabaudi* *in vivo*. *Parasitol. Res.* **2001**, *87*, 795-803.
- Chutmongkonkul, M.; Maier, W. A.; Seitz, H. M. A new model for testing gametocytocidal effects of some antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1992**, *86*, 207-215.
- Contreras, C. E.; Rivas, M. A.; Domínguez, J.; Charris, J.; Palacios, M.; Bianco, N. E.; Blanca, I. Stage-specific activity of potential antimalarial compounds measured *in vitro* by flow cytometry in comparison to optical microscopy and hypoxanthine uptake. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2004**, *99*, 179-184.
- Cooke, B. M.; Mohandas, N.; Coppel, R. L. In *In Malaria and the red blood cell membrane*; Seminars in hematology; Elsevier: 2004; Vol. 41, pp 173-188.
- Deharo, É.; Gautret, Ph.; Mufioz, V.; Sauvain, M. *Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas*; Plural editores: 2000.
- Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *16*, 710-718.
- Dondorp, A. M.; Nosten, F.; Yi, P.; Das, D.; Phyto, A. P.; Tarning, J.; Lwin, K. M.; Arie, F.; Hanpithakpong, W.; Lee, S. J. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 455-467.
- Dong, C. K.; Ugaonkar, S.; Cortese, J. F.; Gamo, F.; Garcia-Bustos, J. F.; Lafuente, M. J.; Patel, V.; Ross, L.; Coleman, B. I.; Derbyshire, E. R. Identification and validation of tetracyclic benzothiazepines as *Plasmodium falciparum* cytochrome bc 1 inhibitors. *Chem. Biol.* **2012**, *18*, 1602-1610.

- Dyer, M.; Day, K. Commitment to gametocytogenesis in *Plasmodium falciparum*. *Parasitology today* **2000**, *16*, 102-107.
- Epstein, J. E.; Tewari, K.; Lyke, K. E.; Sim, B. K.; Billingsley, P. F.; Laurens, M. B.; Gunasekera, A.; Chakravarty, S.; James, E. R.; Sedegah, M.; Richman, A.; Velmurugan, S.; Reyes, S.; Li, M.; Tucker, K.; Ahumada, A.; Ruben, A. J.; Li, T.; Stafford, R.; Eappen, A. G.; Tamminga, C.; Bennett, J. W.; Ockenhouse, C. F.; Murphy, J. R.; Komisar, J.; Thomas, N.; Loyevsky, M.; Birkett, A.; Plowe, C. V.; Loucq, C.; Edelman, R.; Richie, T. L.; Seder, R. A.; Hoffman, S. L. Live attenuated malaria vaccine designed to protect through hepatic CD8(+) T cell immunity. *Science* **2011**, *334*, 475-480.
- Fivelman, Q. L.; McRobert, L.; Sharp, S.; Taylor, C. J.; Saeed, M.; Swales, C. A.; Sutherland, C. J.; Baker, D. A. Improved synchronous production of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *154*, 119-123.
- Fleck, S. L.; Pudney, M.; Sinden, R. E. The effect of atovaquone (566C80) on the maturation and viability of *Plasmodium falciparum* gametocytes *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **1996**, *90*, 309-312.
- Francis, S. E.; Sullivan Jr, D. J.; Goldberg, a. D. E. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual Reviews in Microbiology* **1997**, *51*, 97-123.
- Fry, M.; Pudney, M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1, 4-naphthoquinone (566C80). *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1545-1553.
- Gamo, F.; Sanz, L. M.; Vidal, J.; de Cozar, C.; Alvarez, E.; Lavandera, J.; Vanderwall, D. E.; Green, D. V.; Kumar, V.; Hasan, S. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **2010**, *465*, 305-310.
- Gamo, F.; Sanz, L.; Mendoza, A.; Llergo, J.; Lopez, E.; Gomez-de-las-heras, F. Cytochrome B is the primary target of antimalarial 4(1H)-Pyridones. 2005. Poster ASTMH.
- Gardner, M. J.; Hall, N.; Fung, E.; White, O.; Berriman, M.; Hyman, R. W.; Carlton, J. M.; Pain, A.; Nelson, K. E.; Bowman, S. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2002**, *419*, 498-511.
- Garnham, P. C. C. Malaria parasites and other haemosporidia. *Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. **1966**.
- Gatton, M. L.; Martin, L. B.; Cheng, Q. Evolution of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2116-2123.
- Gething, P. W.; Smith, D. L.; Patil, A. P.; Tatem, A. J.; Snow, R. W.; Hay, S. I. Climate change and the global malaria recession. *Nature* **2010**, *465*, 342-345.
- Global Malaria Mapper, 2015. <http://worldmalariaareport.org/>

- Golgi, C. *Sulla infezione malarica*; Vincenzo Bona: 1886; .
- Grassi, G. B.; Bignami, A.; Bastianelli, G. *Ciclo evolutivo delle semilune nell'Anopheles claviger: ed altri studi sulla malaria dall'ottobre 1898 al maggio 1899*; publisher not identified: 1899; .
- Greenwood, B.; Bojang, K.; Whitty, C.; Targett, G. Malaria. *the Lancet* 2005, 365: 1487-1498. *Publisher Full Text OpenURL* .
- Greenwood, B.; Mutabingwa, T. Malaria in 2002. *Nature* **2002**, 415, 670-672.
- Guiguemde, W. A.; Shelat, A. A.; Bouck, D.; Duffy, S.; Crowther, G. J.; Davis, P. H.; Smithson, D. C.; Connelly, M.; Clark, J.; Zhu, F. Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2010**, 465, 311-315.
- Gupta, S.; Thapar, M. M.; Wernsdorfer, W. H.; Bjorkman, A. *In vitro* interactions of artemisinin with atovaquone, quinine, and mefloquine against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 1510-1515.
- Hay, S. I.; Guerra, C. A.; Gething, P. W.; Patil, A. P.; Tatem, A. J.; Noor, A. M.; Kabaria, C. W.; Manh, B. H.; Elyazar, I. R.; Brooker, S. A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. *PLoS medicine* **2009**, 6, 286.
- Haynes, J. D.; Moch, J. K. In *Automated synchronization of Plasmodium falciparum parasites by culture in a temperature-cycling incubator*; Malaria Methods and Protocols; Springer: 2002; pp 489-497.
- Hoffman, S. L.; Subramanian, G. M.; Collins, F. H.; Venter, J. C. *Plasmodium*, human and Anopheles genomics and malaria. *Nature* **2002**, 415, 702-709.
- Ifediba, T.; Vanderberg, J. Complete *in vitro* maturation of *Plasmodium falciparum* gametocytes. **1981**.
- Iwata, S.; Lee, J. W.; Okada, K.; Lee, J. K.; Iwata, M.; Rasmussen, B.; Link, T. A.; Ramaswamy, S.; Jap, B. K. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* **1998**, 281, 64-71.
- Jiménez-Díaz, M. B.; Rullas, J.; Mulet, T.; Fernández, L.; Bravo, C.; Gargallo-Viola, D.; Angulo-Barturen, I. Improvement of detection specificity of *Plasmodium*-infected murine erythrocytes by flow cytometry using autofluorescence and YOYO-1. *Cytometry Part A* **2005**, 67, 27-36.
- Kafsack, B. F.; Rovira-Graells, N.; Clark, T. G.; Bancells, C.; Crowley, V. M.; Campino, S. G.; Williams, A. E.; Drought, L. G.; Kwiatkowski, D. P.; Baker, D. A. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature* **2014**, 507, 248-252.
- Kidane, G.; Morrow, R. H. Teaching mothers to provide home treatment of malaria in Tigray, Ethiopia: a randomised trial. *The lancet* **2000**, 356, 550-555.
- Kopetzki, D.; Lévesque, F.; Seeberger, P. H. A Continuous-Flow Process for the Synthesis of Artemisinin. *Chemistry-A European Journal* **2013**, 19, 5450-5456.

- Kwiatkowski, D.; Molyneux, M.; Stephens, S.; Curtis, N.; Klein, N.; Pointaire, P.; Smit, M.; Allan, R.; Brewster, D.; Grau, G. Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Q. J. Med.* **1993**, *86*, 91-91.
- Lambros, C.; Vanderberg, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* **1979**, 418-420.
- Laveran, A. A new parasite found in the blood of malarial patients. Parasitic origin of malarial attacks. *Bull Mem Soc Med Hosp Paris* **1880**, *17*, 158-164.
- Lelievre, J.; Berry, A.; Benoit-Vical, F. An alternative method for *Plasmodium* culture synchronization. *Exp. Parasitol.* **2005**, *109*, 195-197.
- Lelièvre, J.; Almela, M. J.; Lozano, S.; Miguel, C.; Franco, V.; Leroy, D.; Herreros, E. Activity of clinically relevant antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* mature gametocytes in an ATP bioluminescence “transmission blocking” assay. *PLoS One* **2012**, *7*, e35019.
- Le Manach, C.; Scheurer, C.; Sax, S.; Schleiferböck, S.; Cabrera, D. G.; Younis, Y.; Paquet, T.; Street, L.; Smith, P.; Ding, X. C. Fast *in vitro* methods to determine the speed of action and the stage-specificity of anti-malarials in *Plasmodium falciparum*. *Malar.J* **2013**, *16*, 424-430.
- Lehninger. Principles of Biochemistry. Lehninger, A.; Nelson, D.; Cox, M. W.H. Freeman and New York: W. H. Freeman, 2013, 6th Ed.
- Luse, S. A.; Miller, L. H. *Plasmodium falciparum* malaria. Ultrastructure of parasitized erythrocytes in cardiac vessels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1971**, *20*, 655-660.
- Marchiafava, E.; Bignami, A. *On summer-autumn malarial fevers*; 1894; .
- Markell, E. K.; Voge, M.; John, D. T. *Parasitologia médica*; McGraw-Hill Interamericana de España: 1990; .
- Marsh, K.; English, M.; Crawley, J.; Peshu, N. The pathogenesis of severe malaria in African children. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1996**, *90*, 395-402.
- Marsh, V.; Mutemi, W. M.; Muturi, J.; Haaland, A.; Watkins, W.; Otieno, G.; Marsh, K. Changing home treatment of childhood fevers by training shop keepers in rural Kenya. *Tropical medicine & international health* **1999**, *4*, 383-389.
- Mather, M. W.; Darrouzet, E.; Valkova-Valchanova, M.; Cooley, J. W.; McIntosh, M. T.; Daldal, F.; Vaidya, A. B. Uncovering the molecular mode of action of the antimalarial drug atovaquone using a bacterial system. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27458-27465.
- Meister, S.; Plouffe, D. M.; Kuhen, K. L.; Bonamy, G. M.; Wu, T.; Barnes, S. W.; Bopp, S. E.; Borboa, R.; Bright, A. T.; Che, J.; Cohen, S.; Dharia, N. V.; Gagarin, K.; Gettayacamin, M.; Gordon, P.; Groessl, T.; Kato, N.; Lee, M. C.; McNamara, C. W.; Fidock, D. A.; Nagle, A.; Nam, T. G.; Richmond, W.; Roland, J.; Rottmann, M.; Zhou, B.; Froissard, P.; Glynne, R. J.; Mazier, D.; Sattabongkot, J.; Schultz, P. G.; Tuntland, T.; Walker, J. R.; Zhou, Y.; Chatterjee, A.; Diagana, T. T.; Winzeler,

- E. A. Imaging of *Plasmodium* liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science* **2011**, 334, 1372-1377.
- Miller, L. H.; Good, M. F.; Milon, G. Malaria pathogenesis. *Science* **1994**, 264, 1878-1883.
- Miller, L. H.; Baruch, D. I.; Marsh, K.; Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. *Nature* **2002**, 415, 673-679.
- Moreno, A.; Joyner, C. Malaria vaccine clinical trials: what's on the horizon. *Curr. Opin. Immunol.* **2015**, 35, 98-106.
- Morrisette, N. S.; Sibley, L. D. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, 66, 21-38; table of contents.
- Newbold, C.; Craig, A.; Kyes, S.; Rowe, A.; Fernandez-Reyes, D.; Fagan, T. Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* **1999**, 29, 927-937.
- Newton, C. R.; Krishna, S. Severe *falciparum* malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol. Ther.* **1998**, 79, 1-53.
- Owens, S. Malaria and the millennium development goals. *Arch. Dis. Child.* **2015**, 100, S53-S56.
- Pagola, S.; Stephens, P. W.; Bohle, D. S.; Kosar, A. D.; Madsen, S. K. The structure of malaria pigment β -haematin. *Nature* **2000**, 404, 307-310.
- Phyo, A. P.; Nkhoma, S.; Stepniewska, K.; Ashley, E. A.; Nair, S.; McGready, R.; ler Moo, C.; Al-Saai, S.; Dondorp, A. M.; Lwin, K. M. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *The Lancet* **2012**, 379, 1960-1966.
- R. B. Malaria. The global malaria action plan. *Roll Back Malaria partnership* **2008**.
- Ridley, R. G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* **2002**, 415, 686-693.
- Roberts, D. R.; Manguin, S.; Mouchet, J. DDT house spraying and re-emerging malaria. *The Lancet* **2000**, 356, 330-332.
- Roncalés, M.; Vidal-Mas, J.; Leroy, D.; Herreros, E. Comparison and optimization of different methods for the *in vitro* production of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Journal of parasitology research* **2012**, 2012.
- Roncalés, M.; Vidal, J.; Torres, P. A.; Herreros, E. *In Vitro* Culture of *Plasmodium falciparum*: Obtention of Synchronous Asexual Erythrocytic Stages. *Open Journal of Epidemiology* **2015**, 5, 71.
- Ross, R. On some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood. *Br. Med. J.* **1897**, 2, 1786-1788.

- Rts, S. Efficacy and safety of the RTS, S/AS01 malaria vaccine during 18 months after vaccination: a phase 3 randomized, controlled trial in children and young infants at 11 African sites. *PLoS medicine* **2014**, *11*.
- Sanz, L. M.; Crespo, B.; De-Cózar, C.; Ding, X. C.; Llergo, J. L.; Burrows, J. N.; García-Bustos, J. F.; Gamo, F. *P. falciparum in vitro* killing rates allow to discriminate between different antimalarial mode-of-action. *PloS one* **2012**, *7*, e30949.
- Schellenberg, D.; Menendez, C.; Kahigwa, E.; Aponte, J.; Vidal, J.; Tanner, M.; Mshinda, H.; Alonso, P. Intermittent treatment for malaria and anaemia control at time of routine vaccinations in Tanzanian infants: a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* **2001**, *357*, 1471-1477.
- Schneweis, S.; Maier, W.; Seitz, H. Haemolysis of infected erythrocytes—a trigger for formation of *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Parasitol. Res.* **1991**, *77*, 458-460.
- Schuster, F. L. Cultivation of *plasmodium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 355-364.
- Sherman, I. W. *Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection*; Zondervan: 1998; .
- Shortt, H.; Garnham, P. The pre-erythrocytic development of *Plasmodium cynomolgi* and *Plasmodium vivax*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1948**, *41*, 785-795.
- Shretta, R.; Omumbo, J.; Snow, R. Community Based Health Care Activity and its Relationship to the Delivery of Insecticide-treated Bed Nets in Kenya. *Ministry of Health, Government of Kenya* **1998**.
- Shulman, C.; Dorman, E.; Cutts, F.; Kawuondo, K.; Bulmer, J.; Peshu, N.; Marsh, K. Intermittent sulphadoxine-pyrimethamine to prevent severe anaemia secondary to malaria in pregnancy: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* **1999**, *353*, 9153-9159.
- Silamut, K.; Phu, N. H.; Whitty, C.; Turner, G. D.; Louwrier, K.; Mai, N. T.; Simpson, J. A.; Hien, T. T.; White, N. J. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *The American journal of pathology* **1999**, *155*, 395-410.
- Sinden, R. Malaria, sexual development and transmission: retrospect and prospect. *Parasitology* **2009**, *136*, 1427-1434.
- Singh, B.; Daneshvar, C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 165-184.
- Srivastava, I. K.; Vaidya, A. B. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1334-1339.
- Steketee, R. W.; Ter Kuile, F. Single low-dose primaquine to reduce malaria transmission. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 91-92.
- Stoute, J. A.; Slaoui, M.; Heppner, D. G.; Momin, P.; Kester, K. E.; Desmons, P.; Wellde, B. T.; Garçon, N.; Krzych, U.; Marchand, M. A preliminary evaluation of a

- recombinant circumsporozoite protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.* **1997**, 336, 86-91.
- Su, X.; Heatwole, V. M.; Wertheimer, S. P.; Guinet, F.; Herrfeldt, J. A.; Peterson, D. S.; Ravetch, J. A.; Wellems, T. E. The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* **1995**, 82, 89-100.
- Talman, A. M.; Domarle, O.; McKenzie, F. E.; Arie, F.; Robert, V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* **2004**, 3, 24.
- TerKuile, F.; White, N.; Holloway, P.; Pasvol, G.; Krishna, S. *Plasmodium falciparum*: *in vitro* studies of the pharmacodynamic properties of drugs used for the treatment of severe malaria. *Exp. Parasitol.* **1993**, 76, 85-95.
- Trager, W.; Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **1976**, 193, 673-675.
- Tripathi, R.; Mishra, R.; Dwivedi, N.; Tewari, N.; Verma, S. Current status of malaria control. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 2643-2659.
- Tun, K. M.; Imwong, M.; Lwin, K. M.; Win, A. A.; Hlaing, T. M.; Hlaing, T.; Lin, K.; Kyaw, M. P.; Plewes, K.; Faiz, M. A. Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: a cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *The Lancet Infectious Diseases* **2015**, 15, 415-421.
- Ubben, D. and Poll, E. MMV in partnership: the Eurartesim® experience. *Malar J* 12.211. **2013**, 10-1186.
- Vinayak, S.; Alam, M. T.; Mixson-Hayden, T.; McCollum, A. M.; Sem, R.; Shah, N. K.; Lim, P.; Muth, S.; Rogers, W. O.; Fandeur, T. Origin and evolution of sulfadoxine resistant *Plasmodium falciparum*. **2010**.
- Wellems, T. E.; Plowe, C. V. Chloroquine-resistant malaria. *J. Infect. Dis.* **2001**, 184, 770-776.
- Wells, T. N.; van Huijsduijnen, R. H.; Van Voorhis, W. C. Malaria medicines: a glass half full? *Nature Reviews Drug Discovery* **2015**.
- Wells, T. Discovering and developing new medicines for malaria control and elimination. *Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)* **2013**, 13, 292-302.
- Wernsdorfer, W.; McGregor, I. The epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implications for its control. *Malaria: principles and practice of malariology. Volume 2.* **1988**, 913-998.
- White, N. J. Drug resistance in malaria. *Br. Med. Bull.* **1998**, 54, 703-715.
- White, N. J.; Ho, M. The pathophysiology of malaria. *Adv. Parasitol.* **1992**, 31, 83-173.
- WHO. *World malaria report 2013*; World Health Organization: **2014**.

- WHO. World Health Organization World Malaria Report, 2012. Geneva: WHO, 2012. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr2013_country_profiles.pdf **2014**.
- WHO. *World malaria report 2013; Malaria Vaccine Technology Roadmap*, **2013**.
- WHO World Health Organization Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. **2010**.
- Zhang, Y.; Plattner, J. J.; Freund, Y. R.; Easom, E. E.; Zhou, Y.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Waterson, D.; Gamo, F.; Angulo-Barturen, I. Synthesis and structure–activity relationships of novel benzoxaboroles as a new class of antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 644-651.